

國立臺灣大學生物資源暨農學院園藝學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Horticulture

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

建立甘藍類作物品種鑑定之 SSR 分子標誌

Development of SSR markers for variety
identification of cole crops (*Brassica oleracea* L.)



指導教授：曹幸之 博士、胡凱康 博士

Advisor: Shing-Jy Tsao , Ph.D. and Kae-Kang Hu, Ph.D.

中華民國九十九年八月

August, 2010

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

建立甘藍類作物品種鑑定之 SSR 分子標誌

Development of SSR markers for variety identification
of cole crops (*Brassica oleracea* L.)

本論文係周奕成君 (R96628105) 在國立臺灣大學園藝學系、所
完成之碩士學位論文，於民國 99 年 06 月 25 日承下列考試委員審查
通過及口試及格，特此證明

口試委員：

曹幸之

(指導教授)

胡凱康

陳榮芳

王仁賢

致謝

本論文幾經波折最後得以完成，絕非吾一己之力所能達成，實要感謝非常非常多人。容我首先感謝我摯愛的爸爸媽媽，千辛萬苦地供我無憂完成學業，無論是生活上的噓寒問暖、心理建設以及每天早上為我準備的愛心便當，感謝你們包容我在這段期間茶來伸手、飯來張口，家事也沒做幾項的把家裡當做旅館，還要感謝外公及泳成不時的關心及幫忙，我用一輩子也報答不完。

承蒙恩師 曹幸之 博士與 胡凱康 博士在求學階段的教導，學生才得以順利完成碩士學業。感謝 曹老師願意收我於門下，從推甄錄取以來的照顧，對學業、實驗、做人處事上的教誨及平日生活上的關心，也感謝老師如此器重學生，將許多實驗室的一些重責大任交付學生，讓學生所學甚多、受益匪淺。感謝 胡老師一直以來對學生的包容，您平日的諄諄教誨以及精闢的見解總讓鑽牛角尖許久的我茅塞頓開，恍然大悟，如沐春風。同時感謝口試委員 王場長仕賢及 陳副所長榮芳對於論文的細心審閱及指正，且給予諸多寶貴意見，彌補缺陷。感謝 常玉強老師在南方氏墨點技術上的指導與建議，獸醫系 鄭穹翔老師在電顯技術上的指導以及對生活上的關心，學生銘感五內。

在實驗的過程中，要感謝農友種苗公司與欣樺種苗提供研究所需的材料，非常感謝農友種苗公司的吳副總，也深以為歉無法完成所託；台南研究農場的陳場長永賢、黃俊傑先生以及貞儀大力的協助，後輩沒齒難忘。感謝佳惠學姐從試驗開始以來的照顧，持續提供給我實驗上所需的材料，雖然我沒有達成預期的目標，還是不斷給我鼓勵，在研究方向及未來發展給予我許多建議。感謝羅筱鳳老師平時的關心與照顧。感謝宜蘭大學恩師鄔家琪、陳素瓊老師過去於實驗操作上的教導，這些經驗讓我得以適應最初的碩士實驗室生涯，以及鄭基榮技佐經常地協助，必銘記在心。

研究的過程中，實在要感謝農藝系諸多夥伴們的幫忙，若不是大家對我的接納、包容、關心以及毫不吝嗇的幫助，並把寶貴的資源分享給我，畢業的這一天不會到來。深深感謝作物育種實驗室的各位，芳華學姐對於實驗操作的指導、HARI 不定時的心得交換、東鴻學長的建議與無時無刻的叮嚀與鼓勵、中和學長在試驗階段的陪伴與督促、群山學長無論在實驗或人生的規劃上語重心長的建議以及幫助，讓我受益良多；心怡在同學期間的心得交流與互相打氣，在畢業之後也一直在實驗與材料上大力幫忙；延諭一進實驗室就展現充分實力，使我很多鑽很久的事情迎刃而解，也與我交換許多心得；馨儀與東岳總是在心情低落時給予關心與打氣；家玄是我的救命恩人，幫我找回無數次硬碟裡的資料，對電腦的專業減少我許多煩惱；也非常感謝植物轉位子實驗室的龐靖及琇淳在南方氏墨點的大力幫忙。

感謝三太、子凱學長以及毓華學姐平時的照顧、對研究方向的建議與指教、試驗材料的提供以及對人生方向的指引讓我無法忘記。賜福學長及婷雅學姐引我進門，帶領我進入台灣大學、在園藝系以及農藝系實驗室的操作及教導，並且給我許多寶貴的建議；金燕、玳瑜、芝蓉、瓊儀學姐的幫忙與叮嚀；瑜筑、亦中、佩潔的互相鼓勵打氣與共同努力；佩真、婉君、唯昭、欣穎在這段期間的幫忙，你們大家讓整個實驗室充滿歡笑。感謝園藝系的嘉祐學長、春賓學長、少雄、若婷、家彬、美蘭、君瑋對電顯、埋蠟切片、研究心得、未來的人生目標給與指教與幫助；志良從大學時期共同努力與相互鼓勵，在碩班同學依然如此；還要謝謝如鳳的一路相伴與默默支持，論文才得以順利完成。要感謝所有曾幫助過我的人，一頁篇幅實難備載，不小心沒被點到名的還是深深感謝你們。回想碩班三年歷歷在目，最大收穫是認識良師與共同奮鬥的摯友，千言萬語道不出我對你們的感謝。隨著論文的完成，也象徵學生生涯的結束，能夠收穫滿滿地離開台灣大學，實為人生最幸福之事。

目錄

口試委員會審定書.....	i
致謝.....	ii
目錄.....	iii
圖表目錄.....	iv
摘要.....	v
Abstract.....	vi
第一章 前言.....	1
第二章 前人研究.....	3
第三章 材料與方法.....	15
一、植物材料.....	15
二、植株園藝性狀調查.....	15
三、SSR 分子標誌分析.....	18
四、資料分析.....	20
第四章 結果.....	27
一、甘藍類蔬菜品種園藝性狀調查.....	27
二、參試樣品之對偶基因檢測.....	28
三、甘藍類各品種之遺傳歧異度與群集分析.....	36
四、甘藍類各品種之主座標分析.....	42
五、甘藍類變種間遺傳歧異度與群集分析與主座標分析.....	42
第五章 討論.....	51
結論.....	55
參考文獻.....	57
附錄.....	65

圖表目錄

表一、供試甘藍類蔬菜之品種與來源.....	16
表二、本次試驗採用 58 組分子標誌測試結果摘要.....	23
表三、各 SSR 標誌在甘藍類變種檢測之對偶基因及頻率.....	33
表四、變種內各品種以 Modified Roger's Distance (MRD) 估算之遺傳距離.....	37
表五、甘藍類各變種以 Modified Roger's Distance (MRD) 估算之遺傳距離.....	48
圖一、各種標誌之表現情形.....	30
圖二、標誌 Ol12D5 之 bin 的表現.....	31
圖三、甘藍類蔬菜品種利用 26 個 SSR 分子標誌所得之 UPGMA 樹狀圖，橫軸 為 Modified Roger's Distance 之遺傳距離.....	44
圖四、甘藍類蔬菜品種以 26 個 SSR 標誌分析結果之主座標分析二維圖.....	46
圖五、甘藍類蔬菜品種以 26 個 SSR 標誌分析結果之主座標分析三維圖.....	47
圖六、以遺傳距離矩陣所繪製 7 個甘藍類變種之 UPGMA 群集分析樹狀圖，橫 軸為 Modified Roger's Distance 之遺傳距離.....	48
圖七、甘藍類 7 個變種及青花筍以 26 個 SSR 標誌分析結果之主座標分析二維圖.....	49
圖八、甘藍類 7 個變種及青花筍以 26 個 SSR 標誌分析結果之主座標分析三維圖.....	49

摘要

本研究利用 65 個品種，共 98 份來自 7 個變種的甘藍類蔬菜材料篩選出 26 個 SSR 分子標誌，在所有受試材料中均可擴增出產物。針對此 98 份材料進行基因座對偶基因分析，目的為建立一套可區分多數甘藍類作物品種的 SSR 分子標誌，為分子標誌實際應用於甘藍類作物品種鑑定建立基礎，並對各變種間親緣關係進行探討。26 個分子標誌共獲得 103 個對偶基因，各基因座可獲得 2 至 12 個對偶基因，平均每個基因座含有 3.96 個對偶基因。分子標誌可偵測的基因型數量從最少 2 個至最多 27 個，平均每個分子標誌可以偵測到 6.92 個基因型。各基因座 PIC 值介於 0.2635 至 0.8488，平均為 0.5399。以此 26 個 SSR 分子標誌可以將本次受試品種均進行區分，各品種之間的遺傳距離介於 0.098 至 0.8605 之間，平均的遺傳距離為 0.651。主座標分析的結果顯示前三個主成解釋量分別為 14.03 %、10.40 %以及 6.78 %，其結果與群集分析結果相同，可將所有材料分為芥藍、青花菜、花椰菜、球莖甘藍、甘藍、抱子甘藍及羽衣甘藍七大群，而兩個青花筍品種則是歸類於青花菜類群中，與預期的七個栽培變種相符合。本研究亦對各變種的可能親緣關係進行探討，由遺傳距離及群集分析結果認為青花菜與花椰菜的親緣關係較近，芥藍與其他變種差異較大，前人研究亦認為芥藍未脫離甘藍類蔬菜的範圍。此外本次試驗在相同品種中發現有差異存在，若欲達成將分子標誌實際應用於品種鑑定的目標，需再進一步掌握品種內存在的變異性。

Abstract

Twenty six SSR markers are screened by 65 cultivars of *Brassica oleracea* L. from seven botanical varieties, with 98 plants tested in total. The objectives of this study are to establish a set of SSR markers to distinguish the majority of cole crops (*Brassica oleracea*), and to serve as a base for including molecular markers as a tool in practical variety identification in cole crops. The genetic relationships between different varieties are also discussed. The 26 primer pairs amplified 103 alleles in total in all plants, the number of alleles per locus of the selected makers ranged from 2 to 12, with an average of 3.96. Number of genotypes detected by each marker ranged from 2 to 27, with an average of 6.92. The PIC values of different markers range from 0.2635 to 0.8488, with an average of 0.5399. The 26 SSR markers could distinguish all cultivars in this study, the genetic distances between pair-wise cultivars range from 0.098 to 0.8605, with an average of 0.651. Principal coordinate analysis (PCoA) and UPGMA cluster showed similar results, all the 65 cultivars separated into seven groups as the taxonomy of botanical varieties, i.e. Chinese kale, broccoli, cauliflower, kohlrabi, cabbage, Brussels sprouts, and kale. Two Broccolini cultivars were classified to the broccoli group. According to the results of genetic distance and cluster analysis of different varieties, broccoli and cauliflower have the closest phylogenetic relationship, Chinese kale is the most distant variety from the other, however, still in same species. The result of intra-cultivar variations indicates that pre-knowledge of the genetic variability within a cultivar is needed before the application of molecular markers in actual variety identification in cole crops.

第一章、前言

甘藍類蔬菜為十字花科 (*Brassicaceae*) 莖苔屬 (*Brassica*) 之一年生或二年生作物，為世界重要蔬菜。一般認為 *B. oleracea* 起源於地中海、西班牙北部、法國西部及英國西南部沿海一帶峭壁的野生種，經由長期園藝性狀選拔及馴化形成外觀形態迥異的各變種，包括甘藍、芥藍、青花菜、花椰菜、球莖甘藍、孢子甘藍、羽衣甘藍等七個變種 (Babula et al., 2007; Dixon, 2007; Song et al., 1988a; Tsunoda et al., 1980)。各變種之間在許多特性上，包括生命週期、花芽創始溫度、結球特性、花部發育特性、葉幅規模、食用部位等有極大差異。關於甘藍類蔬菜各個變種的起源、變種間的遺傳歧異度或親緣關係常被討論，如花菜是否源自青花菜，是否遺傳上更近甘藍 (Crisp, 1982; Gray, 1982; Song et al., 1988a)，芥藍是否應自成一個物種或為 *B. oleracea* 的一個變種 (Vaughan, 1977)，都曾有爭議。判斷莖苔屬作物品種純度及差異，傳統多以外表形態差異來評估，或是利用同功異構酶、二次代謝物種類及含量分析進行比較 (Lazaro and Aguinagalde, 1998a)。然而生化及形態上的標誌所能檢查的多型性有限，且這些表現受到環境及作物發育期的影響。隨著時間各種類型的品種增加，也增加了鑑定的複雜性及困難度。以 DNA 為基礎的分子標誌數量及型態眾多，且不受環境的影響，與傳統田間表現型評估相比，其分析快速準確，極有潛力改善並輔助現有以調查性狀為主的檢測系統。雖然 RFLP (restriction fragment length polymorphisms) 及 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 分析被廣泛應用在莖苔屬作物的親緣及品種鑑定 (Kianian and Quiros, 1992; Phippen et al., 1997; Slocum et al., 1990; Song et al., 1988a; Song et al., 1988b)，但由於 RFLP 繁複的技術及有限的 DNA 探針，能偵測到少數基因座有限；RAPD 則因顯性標誌且有再現性低等問題限制了兩者在品種鑑別的實際應用性 (Tommasini et al., 2003)。

近年來，簡單序列重複 (simple sequence repeat, SSR) 運用在植物品種鑑定上的重要性逐漸增加。其優點包括可提供大量資訊、技術簡單且健全，且隨著分子標誌技術增進，multiplex PCR 技術的發展，在一個反應中可同時進行多個 PCR 擴增。再結合自動 DNA 螢光偵測技術，提高了 SSR 分子標誌的精確度及速度，同時降低了資料取得的成本，因此提高了 SSR 應用在品種鑑定的潛力與可行性 (Hayden et al., 2008a; Hayden et al., 2008b)。

由於莖臺屬作物的經濟重要性，各研究單位對 SSR 分子標誌研究的投入增加。過去對 *B. oleracea* 種相關的品種鑑定或親緣分析的研究常使用由油菜 (*B. napus*) 開發出的 SSR 分子標誌 (Lagercrantz et al., 1993; Szewc-McFadden et al., 1996)。近年由於各物種基因序列資料庫的建立，莖臺屬內各物種的相關基因序列資料增加，有許多研究利用公布在資料庫內的 DNA 序列，針對 *B. oleracea* 設計 SSR 分子標誌，並利用這些分子標誌進行品種間遺傳歧異度的測定。這些研究多使用歐美國育成品種進行鑑定，並未將所有的變種納入分析，無法完整呈現各變種之間遺傳歧異度 (Iniguez-Luy et al., 2008; Louarn et al., 2007; Tonguc and Griffiths, 2004)。

本研究以國內育成甘藍類各變種之品種為主，加上少數國外品種，除前人研究所使用的主要變種外，增加芥藍、球莖甘藍、羽衣甘藍等種類，利用 SSR 分子標誌並搭配 multiplex PCR 技術及自動 DNA 螢光偵測技術進行各變種及品種遺傳變異分析，期望能篩選出可區分多數甘藍類蔬菜品種的 SSR 分子標誌，為實際應用分子標誌於甘藍類蔬菜品種鑑定建立基礎，並且提供 *B. oleracea* 種以下各變種之間歧異度之參考，並針對各變種之間的親緣關係進行探討。



第二章、前人研究

甘藍類 (*Brassica oleracea* L.) 作物

種類 芸薹屬 (*Brassica*) 隸屬於十字花科 (*Brassicaceae*)，共有 39 個物種 (Dixon, 2007; Gupta, 2009; Tsunoda. et al., 1980)，各種類間，形態變異大，染色體數從 *B. deflexa* 的 $n=7$ 到 *B. dimorpha* 的 $n=22$ (Tsunoda et al., 1980)。其中有多種重要園藝及農藝作物，包含食用、飼料用、油料用等種類，為十字花科中最具經濟價值的一屬。禹 (1935) 總結前人的核型分析、雜交試驗等研究結果提出了 “The triangle of U” 假說，將芸苔屬栽培種依其染色體組分為三個基本物種，分別為白菜類 (*B. rapa*; $2n=20$, AA)、黑芥 (*B. nigra*; $2n=16$, BB) 和甘藍類 (*B. oleracea*; $2n=18$, CC)，以及由它們相互雜交所衍生出的西洋油菜 (*B. napus*; $2n=38$, AACC)、芥菜類 (*B. juncea*; $2n=36$, AABB) 和衣索比亞芥 (*B. carinata*; $2n=34$, BBCC) 三個複二元體 (amphidiploids) (Tsunoda et al., 1980)。這些複二元體的來源證據後來由葉綠體 DNA 上的酵素切位相似性以及細胞核 RFLP 分子標誌都得到支持 (Lowe et al., 2002; Song et al., 1988b)。

甘藍類各作物的總稱為 cole crops。分類上 *B. oleracea* L. 可分為 11 個變種，包括：*B. oleracea* L. var. *acephala* DC. (kale, collard, 羽衣甘藍)、*B. oleracea* L. var. *alboglabra* Bailey. (Chinese kale, 芥藍)、*B. oleracea* L. var. *botrytis* L. (cauliflower, 花椰菜)、*B. oleracea* L. var. *capitata* L. (cabbage, 甘藍)、*B. oleracea* L. var. *costata* DC. (tranchuda kale)、*B. oleracea* L. var. *gemmifera* DC. (Brussels sprouts, 孢子甘藍)、*B. oleracea* L. var. *gongylodes* L. (kohlrabi, 球莖甘藍)、*B. oleracea* L. var. *italica* Plenck. (broccoli, 青花菜)、*B. oleracea* L. var. *medullosa* Thell. (marrow stem kale)、*B. oleracea* L. var. *oleracea* L. (wild cabbage, 野生甘藍)、*B. oleracea* L. var. *ramosa* DC. (thousand headed kale)、*B. oleracea* L. var. *sabauda* L. (savoy cabbage, 皺葉甘藍)。但也有認為皺葉甘藍應為甘藍的其中一類。其中羽衣甘藍、芥藍、花椰菜、甘藍、孢子甘藍、球莖甘藍、青花菜為 *B. oleracea* 中 7 個主要栽培群 (cultivar group)，亦為主要甘藍類蔬菜 (洪等, 1992; Dixon, 2007; Kays and Dias, 1995)。

食用部位及種植歷史 甘藍由不結球的野生甘藍演化而來，植株為鬚根性，根群分布在 30 公分內。葉緣有鋸齒，營養生長期莖短縮，其上生長葉片，相互抱合形

成頭狀之葉球，為主要食用部分。早在四千多年前希臘地區已有不結球的野生甘藍（葉甘藍，leafy kales）的栽培記載，直到公元九世紀歐洲各地仍廣泛種植不結球甘藍，經過幾世紀的選拔，於十三世紀始出現結球甘藍，在羅馬與希臘已有食用(Prance and Nesbitt, 2005)。約在十六世紀傳入中國（農家要覽，2005）。臺灣於荷治時期可能有甘藍引入，然而甘藍在臺灣開花不易，無法繁殖採種，日治時期再度引入臺灣試種，才得以普遍推廣。

青花菜原產於義大利，在地中海一帶與美國地區栽培甚多，於十九世紀初傳至日本，再傳至中國大陸。在第二次世界大戰後美援救濟總署提供蔬菜種子，才把青花菜帶至臺灣。其主根基部粗大，根系發達，營養時期莖稍短縮，莖上腋芽不萌發或萌發，需摘除。生殖生長期抽生花莖，花球包括肥嫩的主軸、肉質花梗與未充分發育的花梗，為主要食用部分（張，1998）。

花椰菜原產於地中海的島嶼，十二世紀時土耳其、埃及等地已有花椰菜的記載，法國北部、英國、荷蘭及德國也發現許多花椰菜品種，之後傳入亞洲，中國於元朝時引入栽培。臺灣可能在荷蘭人治理台南時就已引入，到 1680 年代鄭治時期陸續引進閩南的品種。花球為主要食用部位，由肥嫩的主軸與肉質花梗組成，形成半球狀，表面呈顆粒狀，質地緻密（農家要覽，2005）。

球莖甘藍由葉甘藍演變而來，根系淺，在地上短縮莖膨大後，形成肥大可食用的球狀或扁球狀的球莖。在德國栽培比較普遍，十六世紀傳入中國，在大陸各地均有栽培，以東北地區栽培較多，台灣地區於日據初期由日本引進（農家要覽，2005）。

芥藍原產於中國南部與東南亞一帶，在廣東、廣西及福建栽培多。臺灣主要栽培品種從大陸或東南亞引進，其嫩葉及柔嫩肉質花苔為主要食用部位。依花色可分為白花與黃花芥藍，依葉型可分為尖葉與圓葉種，台灣各地均有栽培。

抱子甘藍原產於西北歐一帶，係最初於 1750 年在比利時布魯塞爾與法國之間發現的自然突變種 (Hancock, 2004)。栽培始於十九世紀初，以英國栽培最多，近年美國加州沿海一帶有大面積栽培。台灣於日據時代曾引進栽培，然栽培不易且需求有限，未發展成經濟性栽培。植株直立無分枝，氣溫寒冷時，於每葉基部腋芽形成小芽球，為主要食用部位；球徑約 1.5 - 3 公分，鮮食外多用於冷凍。

羽衣甘藍與野生甘藍親緣關係較接近，且為甘藍類蔬菜中最為耐寒者，廣泛栽培於希臘，為中世紀前、結球甘藍未普及時大部份歐洲地區常食用的蔬菜，在

臺灣甚少栽培。在日本常以羽衣甘藍打汁飲用，稱為「青汁」，可以補充大量維生素、礦物質、纖維素，被視為健康食品，近來又推出乾燥磨碎後以沖泡方式食用的「青汁粉末」，對於常缺乏膳食纖維的外食族而言，為極佳的選擇。

近年來有將芥藍與青花菜雜交選出青花筍，成為一新興蔬菜種類，又稱為西蘭薹、小小青花菜、蘆筍型青花菜，其薹翠綠色，肉質肥嫩，風味鮮甜，口味清甜脆嫩無芥藍特有苦味 (譚，2007)。最初由日本阪田種子公司所發展，Mann Packing Company 以 Broccolini® 申請註冊商標。其特性結合青花菜花球與芥藍的分枝特性，栽培時摘去頂芽後，促進側芽發生。

產業重要性及營養價值 根據 FAO (2008) 統計資料，在 27 項有統計的世界重要蔬菜種類中，甘藍類蔬菜即佔兩項。其一為花椰菜與青花菜，合計收穫面積為 1,063,451 公頃，約佔世界蔬菜生產總面積的 2 %；產量總計為 18,026,726 公噸，約佔世界蔬菜總產量的 7.6 %。另一為甘藍及其他蕓苔屬作物，共同收穫面積為 3,106,963 公頃，約佔世界蔬菜總生產面積的 5.7 %；總產量則為 69,664,185 公噸，約佔世界蔬菜總產量的 2 %。而亞洲的這兩大項，無論是種植面積或者是產量，均佔全世界的 70 % 以上，說明甘藍類蔬菜在亞洲地區的重要性。

根據農委會 97 年農業統計年報，民國 97 年甘藍生產面積為 8,911 公頃，約佔台灣蔬菜生產總面積的 5.8 %，總產量為 348,818 公噸，佔台灣蔬菜總產量 13 %；而花椰菜生產面積為 2,811 公頃，佔台灣蔬菜生產總面積的 1.8 %，總產量為 67,877 公噸，佔台灣蔬菜總產量 2.5 %。花椰菜與甘藍是冬季大宗蔬菜，影響蔬菜市場價格至鉅。

蕓薹屬蔬菜含有許多對健康有益的物質，如維生素 (類胡蘿蔔素、生育醇、抗壞血酸、葉酸)，礦物質 (銅、鋅、磷、鎂等)，碳水化合物 (蔗糖、葡萄糖)，胺基酸 (L-丙胺酸、L-天門冬胺酸、L-穀胺酸、L-穀胺醯胺、L-組胺酸、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-羥丁胺酸、L-色胺酸、L-賴氨酸)，以及不同類群的植物防禦物質 (phytoalexins)，如吲哚 (brassinin、spirobrassinin、brassilexin、camalexin、1-methoxyspirobrassinin、1-methoxyspirobrassinol、methoxyspirobrassinol methyl ether)、酚類化合物 (feruloyl、isoferuloylcholine、hydroxybenzoic、neochlorogenic、chlorogenic、caffeic、p-coumaric、ferulic、sinapic acids、anthocyanins、quercetin、kaempferol)、硫配醣體 (glucoiberin、glucoraphanin、glucoalyssin、gluconapin、

glucobrassicinapin、glucobrassicin、gluconasturtiin、neoglucobrassicin) 等 (Jahangir et al., 2009)。這些化合物在人體具有抗氧化、預防心血管疾病發生之功能。越來越多流行病學相關研究顯示，多食用十字花科蔬菜如甘藍、青花菜、花椰菜、抱子甘藍等可降低癌症發生風險，且每天約攝取 10 g 即可顯著減少其風險。有些蕓薹屬植物汁液經試驗證明，可以有助於避免因致癌物質所引起的肝癌細胞生成 (Jahangir et al., 2009)，唯其降低癌症風險的機制尚未十分清楚。硫配醣體 (Glucosinolates) 為十字花科中數百種次級代謝化合物中首先出現的化合物之一，原始化合物的抗癌活性並不高，當細胞破損，它被黑芥酶水解，產生葡萄糖、硫酸鹽及醣甙配基，再經分裂或分子重組形成異硫氰酸酯 (isothiocyanates)、硫氰酸 (thiocyanates)、唑啉硫酮 (oxazolidine-2-thione)、或腈化合物 (nitriles)，其生成物質決定於硫代配醣體受質種類、黑芥酶、作用時 pH 值以及作用時存在的某些離子。有研究指出少數配基分解的產物可保護細胞抵抗癌症 (Kushad et al., 1999)，而 nitriles 卻具有毒性。

Glucosinolate 及其分解產物造成十字花科蔬菜的苦、辣味以及特別的氣味。這些氣味物質及它們的活性也被研究探討。各種甘藍類蔬菜的硫配醣體含量及種類不同，所具有的保健作用也有差別。雖然十字花科富含礦物質 Ca、Fe，仍為 phytates 等反營養物質的主要來源，與營養物質形成複合體，會降低營養物質的生物利用性 (Jahangir et al., 2009)。且硫配醣體 (glucosinolate) 雖然具有抗癌能力，但因本身與其副產物具有毒性與苦味，野生種的硫配醣體相當高，因此通常人為選拔及馴化的方向為減少硫配醣體的含量 (Hancock, 2004)。

起源與學說 甘藍類作物的起源有多種說法，一部分說法認為 *B. oleracea* 有多個始祖，*B. oleracea* 的組成可能由多個地緣相近的蕓苔屬原始物種經自然雜交後產生，由於其親本與子代混在一起無法區別，又加上千百年來的園藝馴化，產生現今變異如此大的形態變異。現在仍可於地中海一帶的孤立懸崖及小島發現 *B. oleracea* 的野生近緣種類與 *B. oleracea* 雜交後產生的族群，這些不同孤立單元上的族群展現許多外表型的差異。研究認為結球甘藍及羽衣甘藍的原始種為 *B. montana*，球莖甘藍原始種則為 *B. rupestris*；亦有地中海地區的各野生種衍生成當地栽培的地方品種的說法，亦有認為 *B. cretica* 為花椰菜與青花菜的始祖 (Dixon, 2007)。

另外有各甘藍類作物源自同一原始種的說法。由於有許多野生 *B. oleracea* 族群分布在地中海岸的岩石峭壁上、西班牙北部、法國西部、大不列顛南部及西南部，有很多學者認為所有園藝栽培種皆可能只自野生甘藍 (*B. oleracea* L. var. *oleracea*) 演化，偶與其他野生近緣種雜交而成。這些野生近緣種包括 *B. cretica*、*B. insularis*、*B. rupestris*，四者間可自然雜交 (Dixon, 2007)。另有學者認為最早出現的 *B. oleracea* 為 *B. oleracea* L. var. *sylvestris* 的灌木，可能為所有園藝栽培種的祖先，其分布遍及地中海岸的岩石峭壁上、西班牙北部、法國西部、大不列顛南部及西南部。經過近 2500 年來的選拔及馴化而形成現今多變的特性 (Babula et al., 2007)。

作物品種鑑定系統 植物新品種保護國際聯盟 (UPOV) 為推動全球植物新品種保護制度的國際性組織，先於 1961 年制定「植物新品種保護國際公約」，於 1968 年正式施行，分別於 1972、1978、1991 年三度進行修訂，最新版本於 1998 年 4 月正式實施 (Tommasini et al., 2003)。該公約明文規定凡會員國申請權利登記之新品種均需交由政府檢查機關負責進行品種相關性狀檢定，新品種若符合新穎性 (Novelty)、可區別性 (Distinctness)、一致性 (Uniformity) 及穩定性 (Stability)，並具有適當品種名稱者即可申請品種保護。截至 2010 年 4 月止，UPOV 計有 68 個會員國，由於臺灣不是聯合國會員國，不得加入該組織，然而國內亦參考 UPOV 公約制定植物品種與種苗法，於 93 年修正公布，94 年 6 月 30 日正式施行。該法第十二條規定：具備新穎性、可區別性、一致性、穩定性及適當品種名稱之品種，得依本法申請品種權。

傳統品種檢定系統是根據 UPOV 訂定的標準化性狀範圍進行檢測，需要大面積栽培植株以供性狀調查，栽培技術要求高，主觀性強，成本高且耗時 (Louarn et al., 2007)。隨著 UPOV 會員國的增加，已存在的對照品種 (reference variety) 因此增加，更提高了鑑定的複雜性及困難度，難以再利用有限的性狀確實區分這些新品種，進而影響對育種者品種權的保護品質，因此需要發展一套更快速且有效的方法以輔助此檢測系統。

生化及形態上的標誌只能檢測有限的多型性，且受到環境及植株不同發育期的影響 (Tommasini et al., 2003)。相較而言，分子標誌數量類型眾多，且不受環境影響。

分子標誌

種類 分子標誌大致可分為以南方氏雜合 (Southern hybridization) 為基礎與以 PCR (Polymorphism chain reaction) 技術為基礎的兩大類。

以南方氏雜合為基礎的分子標誌主要是 RFLP (Restriction fragment length polymorphism, 限制片段長度多型性), 為最早發展之分子標誌技術。其原理為檢測不同植株 DNA 在限制性內切酶酶切後特定的 DNA 片段的大小, 會因酶切位點發生的突變或是某一段 DNA 發生重組、插入或缺失的情形, 造成酶切位點間的片段長度發生改變, 產生多型性。RFLP 標記應用於基因型檢測上具有相當精確度, 為共顯性標誌且再現性高, 然而在分析時技術繁雜, 費力耗時, 成本相對較高, 因而限制了其應用 (Nguyen and Wu, 2005)。

以 PCR 技術為基礎的分子標誌較多, 常用的有 RAPD (隨機擴增多型性 DNA)、AFLP (Amplified fragment length polymorphism)、SCAR (Sequence characterized amplified region)、CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequence)、ISSR (Inter simple sequence repeat)、SNP (Single nucleotide polymorphism) 以及本研究所用的 SSR (Simple sequence repeats)。

RAPD 是利用一個隨機引子 (一般 8 - 10 個鹼基對) 擴增特定 DNA 片段, 再檢視片段的多型性 (Lazaro and Aguinagalde, 1998b)。其特點是技術簡單、成本較低, 且隨機引子可由廠商購買, 不需知道序列訊息。然而由於引子序列過短, PCR 反應條件對其產物擴增影響甚大, 因而再現性較低, 且其擴增條帶以有或無表示, 為顯性標誌 (Tommasini et al., 2003)。AFLP 以兩種不同限制酶切割生物體 DNA 後, 於 DNA 片段兩端分別接上與限制酶切位相對應的轉接子 (adaptors), 之後以轉接子及限制酶切位的序列設計所需的引子對, 即可藉由 PCR 反應擴增由限制酶切割後的 DNA 片段, 檢視多型性。AFLP 結合了 RFLP 與 RAPD 的優點, 可以在不需預先知道 DNA 序列訊息的情形下在短時間內獲得大量的資訊 (Hale and Farnham, 2005)。

SCAR (核酸序列擴增區段) 是以 RAPD 技術為基礎所發展, 將 RAPD 所產生的多型性片段進行定序後, 依據其序列設計另一組較長的引子對, 以擴增專一性的單一產物。因此 SCAR 比 RAPD 有較高的再現性, 且有部分可能為共顯性標誌。CAPS (限制酵素切割擴增片段多型性) 又可稱為 PCR-RFLP, 主要先針對目標序列區域進行擴增, 所得產物再利用限制酶進行酶切並觀測其酶切片段的大小, 藉由

搭配各種不同限制酶與 PCR 產物，而得到大量多型性 (Nguyen and Wu, 2005)。

SNP (單一核苷酸多型性) 係檢測單一個核苷酸的差異，是在基因組 DNA 序列中的一個核苷酸被另一個核苷酸所取代，或發生幾個核苷酸的插入或缺失，是最普遍發生的一種遺傳變異，在人類的發生機率大約是 0.1%，平均而言，大約每 1 kb 即至少有一個 SNP 的發生。對於已完成基因體定序的物種可以提供更多可能的遺傳標記。然而目前在植物所開發的資訊仍有限，尚未能實際應用於品種鑑定。

SSR (簡單序列重複) 或稱為微衛星序列 (Microsatellite)，是由 1 - 5 個鹼基對所構成的核苷酸序列重複單元 (motif) 重複多次所構成，均勻散佈在高等真核生物的基因組中，在 DNA 複製過程中，有時會有重複單元的重複數目改變。設計在簡單序列重複兩側的引子對，以 PCR 反應擴增此區域以獲得多型性標誌。

ISSR (簡單序列重複間多型性) 則是利用 SSR 序列作為引子，擴增兩個 SSR 序列之間的 DNA 區域獲得之多型性標誌。不需事先得知序列資訊、亦不需放射線標定，如同 RAPD 便於操作及分析，但比 RAPD 具有較高的穩定性及多型性 (Leroy et al., 2000)。

SSR 分子標誌之原理及開發 SSR 多型性形成之機制目前尚未完全了解，其中滑脫 (slippage) 機制推測是微衛星序列產生的主要原因，滑脫機制是染色體複製的過程中，由於局部模板 DNA 序列發生脫離雙股配對的情形，以致 DNA 聚合酶複製到該位置時重複複製相同序列，造成重複單元的重複數目改變 (Lai and Sun, 2003; Schlotterer and Tautz, 1992)，在長遠的演化過程累積了許多這類的重複序列。簡單序列重複的可能功能目前尚未得知，而有少數證據指出嘌呤/嘧啶的交互重複出現，如 (GT) n 與 (GC) n 可能可以藉由形成 Z-DNA 結構參與遺傳重組、基因調控或染色體包裝與縮合 (Lagercrantz et al., 1993)。另外，研究也顯示在植物 SSRs 出現頻率約只為動物的 1/5，最常出現的重複序列為 AA/TT，次為 AT/TA 與 CT/GA。GT/CA 為哺乳類動物中出現最頻繁的雙核苷酸重複單元，在植物中卻相對出現較少。

由於 SSR 兩側序列具有保守性，可設計位於序列兩側的專一引子，以 PCR 將此重複序列擴增。這樣的 SSR 基因座在染色體中出現頻率極高，為典型的單一基因座中具多個對偶基因的共顯性分子標誌 (Tonguc and Griffiths, 2004; Westman and Kresovich, 1998)。SSRs 符合孟德爾遺傳律，符合偵測遺傳變異時所要的理想分子標誌中之許多要求。適合應用於純度檢查、種原歧異度分析及育種程序中以遺傳

距離為基礎進行最佳親本篩選、基因圖譜建立與群體遺傳學等相關研究 (Kimura et al., 2009; Lagercrantz et al., 1993; Louarn et al., 2007; SzewcMcFadden et al., 1996)。早期在哺乳類動物與人類的相關研究顯示重複單元的重複次數在個體間呈現高度多型性，相似結果也由魚類及鳥類研究中獲得。植物相關研究雖較晚，亦顯示植物SSRs具有高度多型性。每個SSR標誌均可提供大量的資訊，因此只需10 - 20個基因座的資料就可以區分基因型。

開發方法 SSR 分子標誌需要先建立該物種之候選基因庫及選植株，然後以人工合成一段重複序列做為探針，標定放射線 ^{32}P 後，以雜合技術標定基因庫中具有重複序列的區域，並針對所標定區域進行定序，最後依定序結果於重複區域兩側設計專一性引子對 (Lagercrantz et al., 1993; Lowe et al., 2004; Szewc-McFadden et al., 1996)。由於基因庫的建立費時費力，成本相對高，且並非所有被辨識出的 SSRs 均可在兩側設計引子對其進行擴增，使過去微衛星序列的發展僅限於重要經濟作物 (Tonguc and Griffiths, 2004; Westman and Kresovich, 1998)。利用小片段插入基因組基因庫 (small-insert genomic library) 或豐富性微衛星序列基因組基因庫 (microsatellite-enriched genomic library) 的方式可大幅增加微衛星序列的選殖效率，且降低成本 (Karagoyozov et al., 1993; Metais et al., 2002; Ostrander et al., 1992)。

近來由於各物種的 DNA 序列資料庫的相繼建立，亦有學者應用資料庫中 EST (Expressed Sequence Tags)、genome shotgun sequences 等資訊中搜尋具有 SSRs 的序列 (Burgess et al., 2006; Kong et al., 2007; Portis et al., 2007; Tonguc and Griffiths, 2004)，並於兩側設計可以使用的引子對，此方式可更有效率地開發出大量的分子標誌。但受限於資料庫中序列資訊的累積多寡，通常相關研究較多的作物才可以使用。另也有研究指出以序列資料庫獲得的分子標誌，能產生的多型性常低於從建立基因庫所獲得者 (Tonguc and Griffiths, 2004)。

由於 SSRs 序列可在物種演化過程中具保守性，因此近年來也有利用序列比對的方式，將已完成全基因體定序的植物 DNA 序列與親緣相近的目標作物基因體進行比對，利用兩者之間相似區域開發能在兩者通用的 SSR 分子標誌，也可提昇研究效率。然而並非所有分子標誌的引子對均可以進行擴增，即使引子對可擴增出產物，兩個親緣相近的物種基因體可能由於重新排列、突變、複製等因素而造成擴增結果有差異，或是擴增產物實際上並非 SSRs 序列而造成誤判的情形。另外假如 SSRs 兩側序列區域發生複製或是發生倒置 (inversion)，可能使單一分子標誌產

生多基因座 (multiple loci)，使得單一引子擴增出多種產物的情形。因此若要大範圍地應用 SSR 分子標誌，可能僅限於經過如 DNA 定序或單一引子擴增測試之後才可使用 (Lowe et al., 2002; Westman and Kresovich, 1998)。

微衛星錨錠片段多型性 (microsatellite-anchored fragment length polymorphisms, MFLP) 亦是開發 SSR 分子標誌的方法之一 (Tonguc and Griffiths, 2004; Yang et al., 2001)。其方法結合 AFLP 與 SSR-anchored primer 技術，以微衛星序列錨錠引子與限制酶的特定接頭 (adaptor) 進行選擇性擴增，再以此擴增產物序列設計引子後，進行擴增重複序列的區域。可同時探查擴增產物中的限制酶切位以及微衛星序列重複單元的重複變異 (Yang et al., 2001)。

SSR 分子標誌多型性之偵測 早期藉由染色法、直接雜合法或是放射顯像法進行偵測 SSRs 分析 (Mansfield et al., 1994)。這些方法在進行對偶基因片段大小分析時常出現穩定性及一致性不佳等問題。近期發展出以螢光技術偵測 SSRs 及片段大小分析為基礎的自動 DNA 片段分析系統，為目前被認為最快速且最精確進行 SSRs 基因定型分析 (genotyping) 的方法之一。通常是在 PCR 引子的一端標定螢光物質後進行 PCR 反應，擴增產物再以膠體電泳進行分離或使用毛細管電泳，結合螢光偵測系統自動偵測。然而此系統缺點在於需在其中一端引子上標定螢光或是放射線物質，引子價格因此甚高。

M13-tailed primer 可解決引子成本過高的問題，已廣泛應用於 SSRs 分析以減少引子標定螢光時的成本 (Boutin-Ganache et al., 2001)。在此方法中應用三種引子，包含與 M13 序列互補的一段 forward 端引子、一段正常的 reverse 端引子，以及標定螢光的 M13 引子。在 PCR 反應的前幾個循環即可將 M13 螢光標定至 SSRs 產物上，而非個別合成每個特定的 SSRs 螢光標定引子。

Hayden 等人將 M13-tailed primer 搭配一項稱為 multiplex PCR 的技術進行結合，發展出 multiplex-ready PCR (Hayden et al., 2008a; Hayden et al., 2008b)。所謂 multiplex PCR 技術是指許多 marker 在同一反應中同時進行擴增，使同一個 PCR 反應中產生多個標誌的產物，在每個反應中獲得較多資訊，減少消耗品及勞力成本的一項技術。此技術可分為兩種，其一為 PCR multiplexing，係指在同一個 PCR 反應中同時擴增數個 SSRs，通常應用於利用少數分子標誌反覆進行基因定型分析，其二為 Post-PCR multiplexing (或稱為 multi-pooling)，指各個 SSRs 分別進行

PCR 反應之後再將 2 個或多個產物混合後進行電泳分析。multiplex-ready PCR 技術使螢光偵測系統可同時偵測許多片段大小不重疊及不同螢光標定的 SSRs 產物，提高了 SSR 分子標誌的精確度及速度，同時降低了資料取得的成本，故提高了 SSRs 應用在品種鑑定的潛力與可行性。

SSR 分子標誌於園藝作物與蕓薹屬作物上之應用 SSR 分子標誌應用於糧食作物之品種鑑定已久，近年來有越來越多研究針對園藝作物進行 SSR 分子標誌的開發，如荔枝 (Li et al., 2006)、甜瓜 (Kong et al., 2007)、胡瓜 (Watcharawongpaiboon and Chunwongse, 2008)；應用於品種鑑定，如葡萄 (Rodriguez-Plaza et al., 2006)、青蔥 (Tsukazaki et al., 2006)、菠菜 (Khattak et al., 2007)、番椒屬 (Portis et al., 2007)、茄子 (Stagel et al., 2008)、香石竹 (Kimura et al., 2009)、大蒜 (Ma et al., 2009)、萵苣 (Simko, 2009)、薔薇科李屬果樹根砧 (Bouhadida et al., 2009)、長豇豆 (Tantasawat et al., 2010; Xu et al., 2010)；純度檢定如番茄 (Bredemeijer et al., 2002)；種源的遺傳組成如菜豆 (Coelho et al., 2009)、梅 (Hayashi et al., 2008)、櫻桃 (Lacis et al., 2009)；作物親緣關係如豆類 (Metais et al., 2002)；及連鎖群圖譜之建立，如菜豆 (Blair et al., 2008)、胡瓜 (Fukino et al., 2008)、馬鈴薯 (Ghislain et al., 2009) 等。

植物基因組有很豐富的簡單重複序列，自 1990 年代有許多針對蕓薹屬的遺傳變異、連鎖圖譜建立等研究。Lagercrantz 等人 (1993) 最先針對油菜 (*B. napus*) 以雜合的方式進行微衛星序列的選殖，共獲得 5 對 SSR 標誌，並對 *B. napus*、*B. rapa*、*B. oleracea* 與 *B. nigra* 等 15 個個體進行基因座檢測，結果在各蕓薹屬物種均可擴增出產物，但並非均有多型性。Kresovich 等人 (1995) 以相同方式從油菜基因組的 15,000 個選殖系中測得 140 個 clone 包含 (GA)、(CA)、(GATA) 三種重複單元所構成的 SSRs，其中以 (GA) 重複最多。兩篇報告共發表 24 個 SSR 標誌，且應用 multiplex PCR 技術進行 SSRs 多型性分析，其中 15 個 SSR 在 3 個 *B. napus*、4 個 *B. rapa*、4 個 *B. oleracea* 品種中具有多型性 (Szewc-McFadden et al., 1996)，但序列的重複數 (repeat number) 與能擴增的多型性未必有一定的關係。

模式植物阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 同屬十字花科，且已完成全基因組定序的工作。將阿拉伯芥上所開發而得的 SSR 標誌應用於蕓薹屬作物可以節省大量開發成本。以 30 組阿拉伯芥的 SSR 標誌檢測蕓薹屬 6 個物種，得到 22 個標

誌可在莖葉屬物種中擴增出產物；並以人工合成探針雜合進行序列確認，只有 7 個標誌確實擴增出簡單重複序列，且產物大小與阿拉伯芥產物相似。其他分子標誌擴增產物中部分的重複序列變更，或是引子序列雖仍存在基因組中，但其重複序列區域卻已消失。這樣的引子對雖不適合用於檢定遺傳變異，但還是可以提供基因組的變化訊息 (Westman and Kresovich, 1998)。以 5 個針對油菜、阿拉伯芥及黑芥所獲得的 SSR 標誌對 32 個跨歐美、印度、衣索匹亞收集的黑芥進行檢測，這些黑芥有栽培種與野生種。結果有 18 個品種可區分開，14 個無法區分。地理距離與標誌分析估算的遺傳距離沒有關聯，而與黑芥之栽培歷史有關 (Westman and Kresovich, 1999)。

Lowe 等人以小片段插入基因組基因庫 (small-insert genomic library) 技術建立 *B. oleracea*、*B. nigra*、*B. napus*、*B. rapa* 的基因庫。在 2002 及 2004 年先後開發出 16 個及 138 個 SSR 分子標誌，其中前者有 13 個具多型性，後者有 86 個標誌在各物種的品種間具多型性，這些分子標誌均進一步應用在油菜遺傳圖譜之建立 (Lowe et al., 2004; Lowe et al., 2002)。此油菜遺傳圖譜係以 1995 年 Parkin 等人以冬油菜品系 N-o-9 以人工合成 (resynthesised) 的油菜品系 SYN1 雜交產生的 N-fo-61-9 油菜雙單倍體 (double haploid, DH) 族群建立，並已定位 90 個 RFLP 基因座，除了缺連鎖群 N16 以外，得到 18 個連鎖群。利用 97 個在親本 N-o-9 及 SYN1 之間具有多型性的 SSR 分子標誌在此族群中進行定位，共獲得 136 個基因座分布在 19 個油菜基因組的連鎖群中，其中 67 個分子標誌定位到 1 個基因座，24 個定位到 2 個基因座，6 個定位到 3 個以上基因座 (Lowe et al., 2002; Lowe et al., 2004)。

近年逐漸朝向以搜尋序列資料庫的方式來開發莖葉屬作物的 SSR 標誌，Tonguc and Griffiths 等人於 (2004) 年從 512 個 *B. oleracea* 的相關 DNA 序列中獲得了 43 個 SSRs，以此獲得 36 個 SSR 標誌。其中有 13 個被應用在包括甘藍、青花菜、花椰菜共 54 個 *B. oleracea* 品種間之遺傳距離鑑定，群集分析的結果可以分為 3 群，其中 2 群為甘藍品種，另一群包含青花菜與花椰菜，且有 5 個品種無法被完全被區分開。可能由於這些品種來自相同的種子公司，其親本相近的緣故。

Louarn 等人 (2007) 獲得了 50 個 SSR 標誌，在甘藍、青花菜等 4 個不同基因型測試，有 24 個標誌具多型性，取其中 11 個對 59 個 *B. oleracea* 品種(包括 5 個變種) 進行遺傳距離鑑定，有 10 個 SSR 標誌都能獲得 0.5 以上的多型性資訊 (PIC value)。供試材料大致分為 4 大群，即花椰菜、紅甘藍、一般甘藍及青花菜群，除

了 8 個品種無法區分外，其他 51 個品種能夠區分。

由 Cold Spring Harbor Laboratory 建構的 454,274 個 *B. oleracea* Genome shotgun sequence，在 C genome 中覆蓋率達 44% (Ayele et al., 2005)，以此序列資訊由 SSR 辨識系統獲得 46,949 個 SSRs，其中 18,913 個為雙核苷酸重複、14,096 個為三核苷酸、6,253 個為四核苷酸、8,407 個為五核苷酸重複。以此方式獲得了 40 個 SSR 分子標誌，其中有 35 個可以在莖薹屬作物上擴增出產物，至少 20 個在 *B. oleracea* 中可擴增出產物 (Burgess et al., 2006)。

目前已有多个相關的 *B. oleracea* 連鎖群圖譜，係分別利用如外表型標誌、同功異構酶、RFLP、RAPD、AFLP、SRAP (Sequence – related amplified polymorphism, SRAP) 等不同型式的標誌陸續建立 (Camargo et al., 1997; Figdore et al., 1993; Kearsey et al., 1996; Kennard et al., 1994; Kianian and Quiros, 1992; Landry et al., 1992; Li et al., 2003; Moriguchi et al., 1999; Sebastian et al., 2000; Slocum et al., 1990)，另外也有利用螢光原位雜交 (fluorescent in situ hybridization, FISH) 建立之 *B. oleracea* 物理圖譜 (Howell et al., 2002)。

近年漸有以 SSR 分子標誌建立的圖譜，多建立在已有的圖譜上。Li (2003) 以雙單倍體花椰菜 ‘An-Nan Early’ 以及青花菜 ‘Early Big’ 雜交建立的 F₂ 族群，以 SRAP 分子標誌建立連鎖群圖譜 (Li et al., 2003)。Gau 等人 (2007) 以此族群再加入 1,062 個 SRAP、155 個 cDNA 分子標誌、26 個 SSR 分子標誌、14 個依已知基因及 BAC clone 的序列所設計的分 子標誌，建構高密度的連鎖群圖譜，在 9 個連鎖群 (BoLG1 ~ BoLG9) 共包含 703 cM。並且利用 26 個 SSR 分子標誌與 77 個 SRAP 分子標誌比對已發表的 5 個連鎖圖譜。結果顯示 BoLG1 到 BoLG9 的連鎖群與 Sebastian 等人 (2000) 建構的連鎖圖譜、Howell 等人 (2000) 的物理圖譜連鎖群有相同結果。後來與油菜的 N11 到 N19 連鎖群也有相似的結果 (Gao et al., 2007)。

Iniguez-Luy 等人於 2008 年利用 3,500 個 GeneBank (<http://ukcrop.net/perl/ace/search/BrassicaDB>) 所公佈的 genomic shotgun sequences (GSS) 設計了 587 個 SSR 分子標誌，命名為 FITO SSR。次年再以其中 146 個 SSR 分子標誌搭配 120 個 RFLP 分子標誌，以雙單倍體青花菜 ‘Early Big’ 以及另一個雙單倍體品系 TO1000DH3 雜交獲得的 F₁ 個體建立連鎖群圖譜，獲得總遺傳長度為 891.4 cM，密度為 3.2 cM/marker (Iniguez-Luy et al., 2009)。

第三章、材料與方法

一、植物材料

供試材料為來自不同種苗公司之甘藍類蔬菜，包括甘藍、芥藍、青花菜、花椰菜、球莖甘藍、羽衣甘藍、青花筍等七類，有 F_1 及開放受粉 (open pollinated populations, OP) 品種。 F_1 品種因預期品種內同質性甚高，因此每個品種以一個單株進行試驗，同時以‘M-48 天花椰’、‘50 天青花’、‘70 天青花’等三個品種各兩個單株做為對照，而 OP 品種則是因品種內具有一定的異質性，因此以 16 個單株代表該品種進行試驗。65 個品種，共 98 份材料。各品種之名稱及來源示如表一。

二、植株園藝性狀調查

於 2009 年 12 月 10 - 14 日、2010 年 1 月 16 日、2010 年 2 月 14 日、2 月 26 日共進行四次育苗，採用 50 孔圓形穴盤。介質為滿地王三號 (農友種苗股份有限公司)，播種於生長箱中，於 3 至 4 片本葉時假植於 3 吋軟盆中，並分別於 2010 年 2 月 25 日、3 月 12 日、3 月 31 日、4 月 7 日、4 月 12 日分次定植於網室盛以滿地王三號介質塑膠籃中。種植前先以台肥 43 號 (15-15-15-4) 拌入介質為基肥，另每 2 週施以 1000 倍花寶 2 號 (20-20-20, HYPONeX[®]) 進行追肥。視需要噴施蘇力菌防治紋白蝶與小菜蛾幼蟲，另以捕鼠板減少老鼠及松鼠危害。

由於場地限制，無論 F_1 或 OP 品種均只定植一株進行外表型觀察，做為同一變種內不同品種間生長特性之參考。園藝性狀調查依「台灣地區現有作物栽培品種名錄 (十字花科篇)」(1994) 所附之品種特性調查項目進行。觀察與測量植株的葉型、株高、葉長、葉寬、節數、莖徑。並以葉綠素計 (Chlorophyll meter SPAD- 502, Minolta, Japan) 測量葉片葉綠素計平均讀值，以葉綠素計讀值將葉片綠色程度進行量化，由植株葉片中隨機挑選 5 片成熟葉進行測量。另依不同變種特有性狀進行調查，如花椰菜為花球直徑、球型、球色、花色、內葉彎曲程度、結球日期，青花菜為花球直徑、球型、球色、花色、結球日期，芥藍為葉面、節間寬、花色，以及甘藍為葉中肋寬、主脈色、球型、葉球色、球重。

表一、供試甘藍類蔬菜之品種與來源

Table 1. The cultivars and sources of *Brassica oleracea* crops tested.

樣品編號	變種	品種名稱	遺傳組成	試驗株數	來源
1	花椰菜	日本 T-168	F ₁	1	瀧井 Takii
2	花椰菜	39 天	F ₁	1	慶農種苗
3	花椰菜	45 天青梗 (S-45)	F ₁	1	慶農種苗
4	花椰菜	65 天青梗 (S-65)	F ₁	1	慶農種苗
5	花椰菜	35 天青梗(S-35)	F ₁	1	慶農種苗
6	花椰菜	80 天青梗 (S-80)	F ₁	1	慶農種苗
7、8	花椰菜	48 天 (M-48), 半硬花球	F ₁	2	慶農種苗
9	花椰菜	50 天 (H-50), 硬花球	F ₁	1	慶農種苗
10	花椰菜	60 天 (M-60), 半硬花球	F ₁	1	慶農種苗
11	花椰菜	愛玉	F ₁	1	農友種苗
12	花椰菜	雪華	F ₁	1	農友種苗
13	花椰菜	雪姬	F ₁	1	農友種苗
14	花椰菜	麗雪	F ₁	1	農友種苗
15	花椰菜	嬌雪	F ₁	1	農友種苗
16	花椰菜	芳雪	F ₁	1	農友種苗
17	花椰菜	白秀	F ₁	1	農友種苗
18	花椰菜	雪玉 65 天 (鬆花)	F ₁	1	欣樺種苗
19	花椰菜	Early white F ₁	F ₁	1	Burpee
20	花椰菜	first white	F ₁	1	Burpee
21	青花菜	45 天青花 (B-45)	F ₁	1	慶農種苗
22、23	青花菜	50 天青花 (B-50)	F ₁	2	慶農種苗
24、25	青花菜	70 天青花 (B-70)	F ₁	2	慶農種苗
26	青花菜	清華	F ₁	1	農友種苗
27	青花菜	清華二號	F ₁	1	農友種苗
28	青花菜	翠翠	F ₁	1	農友種苗
29	青花菜	永翠	F ₁	1	農友種苗
30	青花菜	天綠	F ₁	1	農友種苗
31	青花菜	綠帝	F ₁	1	台灣農產種苗
32	青花菜	814 青花	F ₁	1	瀧井 Takii
33	芥藍	永春	F ₁	1	農友種苗
34	芥藍	翠津	F ₁	1	農友種苗
35	芥藍	蕙津	F ₁	1	農友種苗
36	芥藍	翠寶	F ₁	1	武藏野種苗園

表一、續

Table 1. continued.

樣品編號	類型	品種名	遺傳組成	株數	來源
37	芥藍	大豐	F ₁	1	瀧井 Takii
Ch1~16	芥藍	黑芥藍	OP*	16	新裕森
38	甘藍	夏秋	F ₁	1	農友種苗
39	甘藍	高峰	F ₁	1	農友種苗
40	甘藍	和風	F ₁	1	農友種苗
41	甘藍	夏光	F ₁	1	農友種苗
42	甘藍	新峰	F ₁	1	農友種苗
43	甘藍	翠峰	F ₁	1	農友種苗
44	甘藍	輝峰	F ₁	1	農友種苗
45	甘藍	頂峰	F ₁	1	農友種苗
46	甘藍	純英	F ₁	1	農友種苗
47	甘藍	初秋	F ₁	1	農友種苗
48	甘藍	春陽	F ₁	1	農友種苗
49	甘藍	陽光 45 天	F ₁	1	台灣農產種苗
50	甘藍	陽光 50 天	F ₁	1	台灣農產種苗
51	甘藍	陽光 52 天	F ₁	1	台灣農產種苗
52	甘藍	陽光 60 天	F ₁	1	台灣農產種苗
53	甘藍	台農 104	F ₁	1	台灣農產種苗
54	甘藍	好味甘藍	F ₁	1	台灣農產種苗
55	甘藍	T-530 甘藍	F ₁	1	瀧井 Takii
56	甘藍	T-968 甘藍	F ₁	1	瀧井 Takii
57	甘藍	冬取甘藍	F ₁	1	瀧井 Takii
58	甘藍	T-523 甘藍	F ₁	1	瀧井 Takii
59	甘藍	Takii 中生紅甘藍	F ₁	1	瀧井 Takii
60	甘藍	夏之星	F ₁	1	欣樺種苗
61	甘藍	春秋 1 號	F ₁	1	溪湖農生種子
62	球莖甘藍	Winner	F ₁	1	瀧井 Takii
63	羽衣甘藍	kale Winterbor	F ₁	1	Park seed
64	羽衣甘藍	kale Redbor	F ₁	1	Park seed
65	青花筍	元氣青花菜筍	F ₁	1	新合成
66	青花筍	綠優青花菜筍	F ₁	1	台灣農產種苗
Bru1~16	抱子甘藍	抱子甘藍	OP*	16	台灣農產種苗

*Open pollinated

三、SSR 分子標誌分析

1. SSR 分子標誌搜尋

試驗所使用之 SSR 分子標誌主要參考資料庫 <http://www.brassica.info>、UK CROPNET *Brassica* database (<http://ukcrop.net/per/ace/search/BrassicaDB>) 以及其他研究單位所發展公布之 genetic marker 資料庫，包含了英國國家園藝研究中心 (HRI, Horticulture Research International, UK) 開發之分子標誌，以及發表於文獻之分子標誌 (Lagercrantz et al., 1993; Lowe et al., 2002; Lowe et al., 2004; Smith and King, 2000; Szewc-McFadden et al., 1996)。HRI 將這些分子標誌在十字花科各主要作物上測試的結果進行歸納，包括擴增情形、是否具多型性等，並給予評分，從最高 1 分到最低 5 分。試驗先初步挑選網站中評分 1 及 2 分的標誌，另加上數組已應用於甘藍類作物品種鑑定的 SSR 標誌以及已應用於遺傳圖譜建立的 SSR 標誌 (Iniguez-Luy et al., 2009; Iniguez-Luy et al., 2008; Louarn et al., 2007; Tonguc and Griffiths, 2004) 進行測試；並對照網站 <http://www.brassica.info> 中的定位資訊以及其他文獻發表的連鎖群圖譜 (Gao et al., 2007; Iniguez-Luy et al., 2009)，最後依據已應用於遺傳圖譜建立的情形挑選標誌，使每一條染色體上至少有一個 SSR 標誌分布其上。

本試驗採用 multiplex-ready PCR 技術，將所有挑選的 SSR 標誌的正、反向端引子上皆在其序列的 5'端分別添加上 5'ACGACGTTGTAAAA 3'與 5'CATTAAAGTTCCCATTA 3'，在進行 PCR 反應時，另外分別加入標定不同顏色螢光 (VIC、PET、NED、6-FAM) 的 tagF 引子以及無標定螢光的 tagR 引子。以試驗品種中選用 24 個品種之 DNA 進行測試，淘汰各種表現異常之標誌，剩餘的分子標誌對所有受試材料進行正式分析 (表二)。

SSR 分子標誌之引子及無標定螢光的 tagR 引子係由源資國際生物科技股份有限公司 (Tri-I Biotech, Inc.) 與富聯生物科技股份有限公司 (VIOGENE) 所合成。標定不同顏色螢光 (VIC、PET、NED、6-FAM) 的 tagF 引子則由美商應用生命系統 (Applied Biosystems, ABI) 所合成與標定。

2. 葉片總 DNA 萃取、定量及品質檢定

取 0.05 g 新鮮葉片剪碎後置入 2 ml 離心管中，冷凍乾燥後加入玻璃珠以研磨機磨成粉。材料總 DNA 之抽取由 (Doyle and Doyle, 1990) 的 CTAB 法加以修改。

即乾燥的葉片粉末，加入 800 μ l 的 CTAB-PVP 溶液 (2 % CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 100 mM Tris Base, pH 8.0，使用前加入 0.2 % β -ME (2-mercaptoethanol), 1 % PVP) 劇烈搖晃使溶液與樣品粉末均勻混合後，置於 65 $^{\circ}$ C 的水浴槽中加熱 30 分鐘，完成後以 16,000 g (14,299 rpm) 離心 10 分鐘。倒取上清液於 1.5 ml 微量離心管中，加入 500 μ l chloroform:isoamyl alcohol (24:1)，以 vortex 劇烈震盪 30 秒使呈乳狀，以 16,000 g (14,299 rpm) 離心 10 分鐘。取上清液加入 1/2 體積的 5M NaCl，均勻混合後再加入 0.6 倍體積的 isopropanol，緩慢反轉離心管以均勻混合，於室溫下靜置 1 小時以上。以 5,009g (8,000 rpm) 離心 5 分鐘，倒出上清液，加入 1 ml wash buffer (0.2 M sodium acetate (NaOAc)，75 % ethanol) 上下搖動使 DNA 浮起；以 16,000 g (14,299 rpm) 離心 5 分鐘，倒出 wash buffer，加入 1 ml 75 % ethanol，上下搖動使 DNA 浮起以清洗鹽類，16,000 g (14,299 rpm) 離心 5 分鐘，倒出 ethanol，倒置陰乾。加入 50-100 μ l TE buffer，以微量吸管吸放幾次以加速溶解為 DNA 萃取母液，並置於 -20 $^{\circ}$ C 下備用，使用前以 QH₂O 稀釋成 10 ng/ μ l。

取 2 μ l 的 DNA 萃取液以分光光度計 (Nano Drop-1000) 進行定量後，加入 1 μ l 的 6 $\times$ Loading dye (0.2 % bromophenol blue, 0.2 % xylene cyanolo FF, 60 % glycerol, 60 mM EDTA)，以 1 % Agarose I 膠片，0.5 $\times$ TBE buffer，100 V 進行電泳，檢視 DNA 品質與產量。

3. SSR multiplex-ready PCR

依據 Hayden et al. (2008) 提出的 multiplex-ready PCR 技術進行聚合酶連鎖反應，但採用 Post-PCR multiplexing 的方式，亦即每個 PCR 反應中只擴增一個 SSRs 產物，之後再將標定不同波長螢光者進行混合。每產物之每反應總體積為 10 μ l，其中包括 20 ng DNA、1 $\times$ ImmoBuffer (Bioline, 16 mM (NH₄)₂SO₂, 0.01 % Tween-20, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3)、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM dNTP、40 nM Forward 引子、40 nM Reverse 引子、80 nM 標定螢光的 tagF 引子 (依實驗的設計加入標定 VIC、PET、NED 或 6-FAM 四種不同螢光的 tagF 引子)、80 nM 無標定螢光的 tagR 引子、0.25 U Taq DNA Polymerase (Bioline)，最後以 QH₂O 將總體積補至 10 μ l。聚合酶連鎖反應則是以熱循環反應器 (GeneAmp[®] PCR System 9700, PE Applied Biosystems) 進行。反應條件為 95 $^{\circ}$ C 10 分鐘；92 $^{\circ}$ C 30 秒、63 $^{\circ}$ C 1 分 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分鐘，

共 20 個循環；92 °C 15 秒、54 °C 30 秒、72 °C 1 分鐘，共 40 個循環；72 °C 30 分鐘；最後 4 °C 保存反應產物。

4. 毛細管電泳分析

將 PCR 產物依照所標定的螢光按 VIC：PET：NED：6-FAM 為 1：3：2：2 的比例進行混合，每個反應取混合液 0.5 µl，加入 0.25 µl GeneScan™ 600 Liz® size standard (Applied Biosystems, ABI)，最後加入 9.25 µl Hi-Di™ formamide (Applied Biosystems, ABI)，總體積為 10 µl。混合均勻後置於乾浴槽中以 95 °C 加熱 3 分鐘，並迅速移置冰水中冷卻數分鐘。以遺傳分析儀 (Prism® 310 Genetic Analyzer, ABI) 進行毛細管電泳及螢光自動偵測，所得的 SSRs 片段螢光資料再以 Gene Mapper® v 4.0 (Applied Biosystems, ABI) 進行分析。

四、資料分析

1. 螢光資料判讀

分析方式是先判讀每個反應中所加入的標準片段樣品 (GeneScan™ 600 Liz® size standard) 繪製標準曲線，再以內插法換算此區間內的未知樣品片段大小。判讀對偶基因時利用程式中 Auto Bin 的功能挑出偵測品質較好的樣品做為參考樣品，依據參考樣品的波峰形狀、stutter band 表現情形、訊號強度等表現的趨勢判斷其餘樣品的波峰是否為對偶基因之一，否則可能為雜訊。原則上在篩選分子標誌時挑選跡痕條帶 (stutter band) 出現在主要波峰的左邊，也就是出現跡痕條帶比主要條帶小的分子標誌為主，當螢光偵測到兩個相當高的波峰時，若片段較小的波峰較右邊波峰高時則視為異質結合；反之則定義為較小的條帶為主要條帶所產生的跡痕條帶 (圖一 b)。

螢光判讀原始資料紀錄方式是以基因座所出現的片段大小代表每個對偶基因，樣品若只出現一個對偶基因視為同質結合，記為 1；若個體無此對偶基因者記為 0；若同時出現兩個對偶基因則視為異質結合，各記為 0.5。由於供試甘藍類為二倍體，若樣品判定出現三個對偶基因表示該分子標誌偵測到 multiple alleles，由於無法分析而將該分子標誌淘汰 (圖一 g)。

2. 分子標誌多型性訊息提供量 (Polymorphism information content, PIC)

根據 Botstein 等於 1980 所提出的 PIC value，經 Anderson 等人於 1993 年修改後的計算方式 (Anderson et al., 1993; Botstein et al., 1980; Louarn et al., 2007)：

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n p_{ij}^2$$

其中 p_{ij} 表示第 i 個分子標誌中，第 j 個對偶基因出現的頻度， n 為該分子標誌含有的對偶基因數目。

3.遺傳距離計算

各受試品種間遺傳距離以 Modified Roger's Distance (MRD) 進行估算 (Morales et al., 2010; Reif et al., 2003)：

$$d_w = \frac{1}{\sqrt{2m}} \sqrt{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (p_{ij} - q_{ij})^2}$$

其中 p_{ij} 與 q_{ij} 分別表示在兩個品種間第 i 個基因座中出現的第 j 個對偶基因的頻度， m 則為分子標誌的數目， n_i 則為該分子標誌中對偶基因的數目。將原始資料轉換為 AA、BB、AB 的基因型資料後，再以 4 位數字表示每個樣本的基因型，如 AA 以 0101 表示，BB 以 0202 表示，AB 以 0102 表示，轉換後的資料輸入 TFPGA ver.1.3 (Miller, 1997) 進行分析。

各受試變種間遺傳距離則是利用整理於表三的各變種中對偶基因出現頻率，將每個變種視為一個資料點，以 Modified Roger's Distance (MRD) 進行各變種間遺傳距離之估算，便於更清楚顯示各變種之間關係。

4.群集分析

將遺傳距離分析所獲得的矩陣以 NTSYS pc2.2 軟體 (Rohlf, 2008) 中的 Cluster 類別的 SAHN 模組，使用非加權配對算術平均法 (Unweighted pair-group method, arithmetic average, UPGMA) 進行演算，並選擇使用 WARN，當分群結果中超過一對最相近群組間出現等距的情況發生時，只列出第一種分群順序的結果，進行群集分析後，分別畫出變種之間以及各受試品種間群集分析樹狀圖。

5.主座標分析 (Principal Coordinate Analysis, PCoA)

將遺傳距離均換算為平方距離再乘以 -0.5 後，以 NTSYS pc2.2 軟體中

Transformation 類別的 Dcenter 模組將品種間的遺傳距離經雙向校正後，再以 ordination 類別的 Eigen 模組進行特徵值 (eigenvalue) 與特徵向量 (eigenvector) 的計算。將此結果輸入 SigmaPlot 2001 for Windows ver. 7.0 (SPSS Inc.) 中繪製變種之間以及各受試品種在二維平面以及三維空間的關係。



表二、測試 58 組 SSR 分子標誌之結果摘要

Table 2. Summary of 58 SSR markers tested in this study.

No.	Marker name	Chr. No. ^a	Motif	Observed Size Range	Number of alleles ^b	Observed Genotype ^b	PIC ^b	螢光 ^b	Panel ^c	reference
1	MB1		(GA) ₉	189-191	2	3	0.4467	VIC	1	(a)
2	MB2		(GA) ₂ GC(GA) ₄ A(GT) ₂	69-160	11	-	-	-	-	(a)
3	MB4	C9	(TG) ₁₀	87-100	4	7	0.3347	NED	1	(a)
4	MB5		(AT) ₃ GT(AT) ₄ (GT) ₈	116-118	2	-	-	-	-	(a)
5	BN12A	C1	(GA) ₁₁ (AAG) ₄	274-315	4	7	0.5715	VIC	2	(b)
6	BN38A		(TG) ₁₁	182	1	-	-	-	-	(b)
7	BN72A	C4	(TAA) ₅ (GA) ₉	269-276	7	-	-	-	-	(b)
8	BN83B1	C3	(GA) ₁₁	211-220	4	9	0.7265	6-FAM	2	(b)
9	CALSSR	C1	unknown	167-183	3	-	-	-	-	(c)
10	SSR Na10-D03		(GT) ₁₁	176-203	3	5	0.4999	NED	3	(d)
11	SSR Na10-E02		(GA) ₂₄	89-150	7	-	-	-	-	(e)
12	SSR Na10-F06		(CCG) ₆	126-144	3	4	0.5065	VIC	4	(e)
13	SSR Na12-A01		(CT) ₃₄	142-170	8	-	-	-	-	(e)
14	SSR Na12-A02		(CT) ₁₆	186-192	3	5	0.6094	NED	4	(e)
15	SSR Na12-A07		(GT) ₁₁	178-182	2	5	0.4633	6-FAM	4	(e)
16	SSR Na10-B10		(GGC/A/T) ₁₈	155-240	4	-	-	-	-	(e)
17	Ni4B10	C8	(CT) ₂₀	203-220	4	-	-	-	-	(e)
18	Ol10F11	C8	(GGC) ₇	174-179	2	2	0.3992	PET	1	(e)
19	Ol12F2	C6	(TC) ₂₉	176-194	5	-	-	-	-	(e)
20	Ol12G4	C7	(TC) ₂₄	112-166	5	-	-	-	-	(e)
21	Ol10H4	C4	(CT) ₂₉	206-215	4	-	-	-	-	(e)
22	Ol12D5	C7	(CT) ₃₂	137-165	12	27	0.8488	PET	7	(e)
23	Ol10F12	C2	(CT) ₆₄	139-167	4	-	-	-	-	(e)
24	Ol11H8	C2	(AG) ₂₄	無產物	-	-	-	-	-	(e)
25	BoABI1		(TC) ₁₆	188-206	7	15	0.7375	VIC	5	(f)

表二、續

Table 2. continued.

No.	Marker name	Chr. No. ^a	Motif	Observed Size Range	Allele Number ^b	Observed Genotype ^b	PIC ^b	螢光 ^b	Panel ^c	reference
26	BoPC15		(TTTAA) ₂ (ATA) ₇	200-208	5	9	0.6047	PET	5	(f)
27	BoPLD1		(CT) ₇ (AT) ₇₋₁	289-298	3	6	0.4984	NED	5	(f)
28	BoCALa		(AT) ₅ (TA) ₆	231-251	7	12	0.7750	6-FAM	5	(f)
29	BoCALb		(TA) ₆₋₁	266-270	3	6	0.5859	PET	3	(f)
30	BoCALc		(TAA) ₃₋₁ (AT) ₇₋₁ (AT) ₃	209-228	4	-	-	-	-	(f)
31	BoREM1b		(AAG) ₅	193-214	3	6	0.5137	PET	4	(g)
32	BoDCTD1		(AGA) ₆	168-191	4	8	0.6716	6-FAM	3	(g)
33	BoCAM1		(GA) ₅	235-240	2	4	0.2635	VIC	6	(g)
34	BoKAH45TR		(TTG) ₆	無產物	-	-	-	-	-	(g)
35	BoIAB20TR		(CAC) ₉	162-165	2	-	-	-	-	(g)
36	BoIAB19TF		(GA) ₆	273-284	5	6	0.5864	NED	6	(g)
37	BoIAB94TF		(CGG) ₅	222-224	2	3	0.4325	VIC	7	(g)
38	BoPC34		(ATG) ₅	158-162	2	3	0.4998	6-FAM	6	(g)
39	FITO353	C5	unknown	342-358	5	7	0.4564	6-FAM	7	(h)
40	FITO259	C5	unknown	257-258	2	-	-	-	-	(h)
41	FITO497	C7	unknown	352	1	-	-	-	-	(h)
42	FITO398	C7	unknown	398-408	4	-	-	-	-	(h)
43	FITO472	C7	unknown	383-390	2	-	-	-	-	(h)
44	FITO161	C2	unknown	無產物	-	-	-	-	-	(h)
45	FITO102	C4	unknown	262	1	-	-	-	-	(h)
46	FITO514	C4	unknown	390-414	2	-	-	-	-	(h)
47	FITO400	C6	unknown	250	1	-	-	-	-	(h)
48	FITO565	C6	unknown	405-406	2	-	-	-	-	(h)
49	FITO377	C4	unknown	361-373	2	-	-	-	-	(h)
50	FITO067	C6	unknown	418	1	-	-	-	-	(h)

表二、續

Table 2. continued.

No.	Marker name	Chr. No. ^a	Motif	Observed Size Range	Allele Number ^b	Observed Genotype ^b	PIC ^b	螢光 ^b	Panel ^c	reference
51	FITO043	C6	unknown	180-203	5	6	0.5680	NED	8	(h)
52	FITO036	C6	unknown	214-223	2	3	0.3592	6-FAM	8	(h)
53	FITO190	C6	unknown	無產物	-	-	-	-	-	(h)
54	FITO429	C6	unknown	無產物	-	-	-	-	-	(h)
55	sORA21b	C6	(GA) ₂₂	110-150	12	-	-	-	-	(i)
56	sORA26	C5	(GA) ₅	108-110	2	3	0.3800	PET	2	(i)
57	sORA43	C5	(GGC) ₇	193-207	5	9	0.6999	NED	2	(i)
58	Ap1a 5pr	C9	unknown	203-225	6	-	-	-	-	(j)
	All loci				3.96	6.92	0.5399			

a. Chromosome number, 已應用於遺傳圖譜建立且定位於染色體上的分子標誌, C 代表藝臺屬的 C genome, 數字代表染色體數目

b. 唯有選用之分子標誌於 Allele Number、Observed Genotype、PIC 值、螢光 Label、Panel 等欄位中有資料存在

c. 為毛細管電泳分析前進行 post-PCR multiplexing 時混合之單位, 相同 panel 代表於同一反應中進行毛細管電泳

(a) (Lagercrantz et al., 1993)

(b) (SzewcMcFadden et al., 1996)

(c) (Smith and King, 2000)

(d) (Lowe et al., 2002)

(e) (Lowe et al., 2004)

(f) (Tonguc and Griffiths, 2004)

(g) (Louarn et al., 2007)

(h) (Iniguez-Luy et al., 2008)

(i) HRI unpublished (Periam, N; King GJ)

(j) HRI unpublished (Barker GC)



第四章、結果

一、甘藍類蔬菜品種之園藝性狀

本試驗於 2009 年 12 月 10 - 14 日第一次育苗，並於 2010 年 2 月 25 日到 4 月 7 日之間陸續定植。花椰菜 ‘45 天青梗’、‘65 天青梗’、‘雪華’、‘first white’ 及青花菜 ‘永翠’ 等五個品種由於發芽情形不好，幼苗期生長發育較差，再於 2010 年 3 月 5 日播種，在 2010 年 6 月 20 日試驗結束前仍未定植於網室，其餘品種性狀調查結果見附錄一。

育苗期間植物生長箱溫度控制故障而造成持續低溫，因此許多早生花椰菜與青花菜品種於定植前已完成春化作用，在定植前或定植後不久即形成小花球，且有小株抽薹的情形，如花椰菜品種 ‘35 天青梗’、‘48 天花椰’、青花菜品種 ‘45 青花’、‘50 天青花菜’。部分品種之花球遭老鼠啃咬，如 ‘白秀’ 及 ‘70 天花椰’，‘80 天青梗’，而 ‘50 天花椰’ 花球完全被吃掉，也無法比較各品種花球大小、抽薹情形與花色。試驗後期 (5 月份) 平均氣溫漸升，多數品種出現花球黃化或未抽薹開花即消蕾的情形，如：花椰菜 ‘日本 T-1-168’、‘39 天花椰’、‘芳雪’ 抽薹後所有花蕾均焦枯消蕾，無法開花，多數青花菜品種 ‘翠翠’、‘天綠’、‘70 天青花’、‘清華’、‘清華 2 號’ 以及青花筍 ‘元氣’ 則是部分花球黃化，抽薹後多數花蕾枯死，僅少數開花結莢。花椰菜 ‘嬌雪’ 及 ‘麗雪’ 於結球後期有部分花球隆起抽薹的情形。‘雪姬’ 是部分花球潰爛，因此多數花椰菜與青花菜沒有評估採收期。

由於各品種定植時間與定植時的株齡不一致，且部分花球無法生長至適收期，僅依照各品種播種至結花球或葉球所需時間推估成熟性。以營養生長期長短為準，大致可將花椰菜品種分為早生 (58-64 天)、中生 (76-87 天) 及晚生種 (97-107 天)；青花菜品種分為早生 (69 天)、中生 (83-88 天)、晚生種 (92-108 天)；甘藍分為早生 (67-75 天)、中生 (80-81 天)、晚生種 (88-101 天)，中晚生的品種在株型、株高、葉長、葉寬、節數上大致較早生品種為大或多 (附錄一)。依試驗結果所分類的成熟性與種苗公司提供的品種性狀有所出入。正常判斷成熟期以定植後至採收的天數來估算，一般花椰菜的早生品種以定植後 45 天以內採收者，中生品種為 60 天左右，晚生品種則是 80 天以上。青花菜早生品種為 50 - 60 天、中生品種為 70 - 90 天、晚生品種為 100 - 120 天。甘藍早生種約為 50 - 60 天，中生品種約為 60 - 65 天，中晚生為 70 天左右。

各變種的葉片顏色以葉綠素計平均讀值表示，花椰菜介於 38.4 至 57.7 之間，青花菜介於 50.3 至 63.7 之間，甘藍由 43.8 至 66.8，芥藍介於 51.6 至 62.9，球莖甘藍為 58.7，抱子甘藍為 38.7，羽衣甘藍為 33.4 至 41.7。整體而言，各變種以青花菜與芥藍的葉色較為深綠，甘藍葉色在品種間差異較大。

在試驗期間有正常開花的供試品種中有 4 個品種花器呈雄不稔性狀，分別是青花菜‘清華’及‘清華二號’、青花筍‘綠優’及‘元氣’。四者均屬於因雄蕊完全消失或退化，導致小孢子無法產生的結構型雄不稔 (structural male sterility)。其中‘清華’、‘清華二號’經口頭查證 (陳永賢，個人諮詢)，以及利用 Ogura CMS 專一性分子標誌 (Forward Primer：5'-AGAGGAATTGGTCAACTCATCA-3'、Reverse Primer：5'-ATCCCTGCAGACAGCTTCATTAC-3') (Yamagishi and Terachi, 1997; Yamagishi and Terachi, 2001) 進行檢測後，確定為 Ogura 細胞質雄不稔 (Cytoplasmic male sterility, CMS)，而‘綠優’青花筍、‘元氣’青花筍則未知。

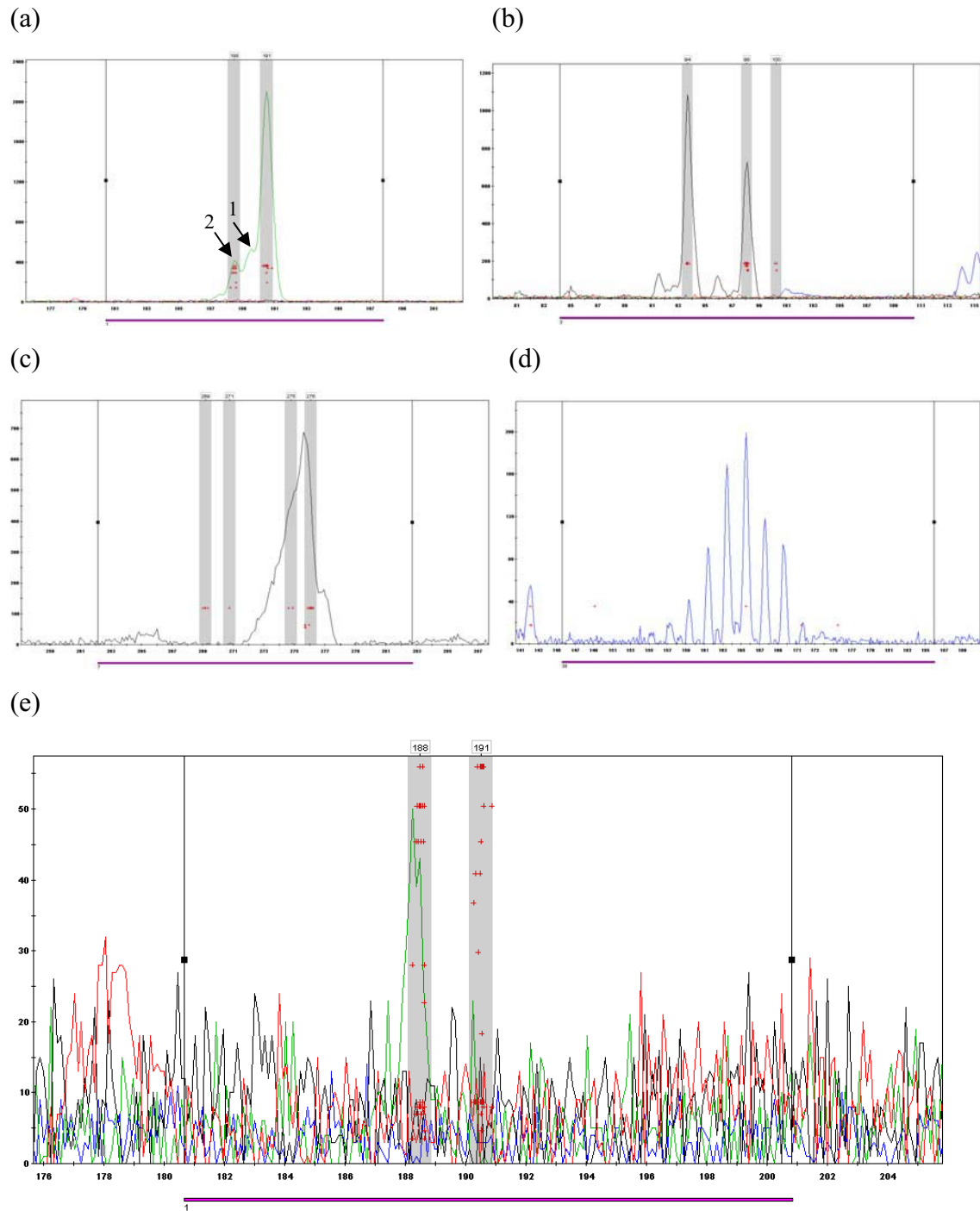
二、參試樣品之對偶基因檢測

1. 初步篩選

在選用的 58 組 SSR 分子標誌中，最後篩選出 26 組標誌進行所有受試材料的基因型分析 (表二)。被淘汰的標誌，有些因無法擴增出任何產物，如：BoKAH45TR、OI11H8、FITO161、FITO190、FITO429；有些標誌在大部分品種中增幅效果正常，但在部分品種中增幅效果非常微弱 (圖一 e)，包括 SSR Na10-E02、FITO398、FITO472、FITO565、FITO497、MB5、OI10H4、FITO259、FITO514；另外有分子標誌在染色體中同時偵測到 2 個以上對偶基因，稱之為 multiple allele (圖一 g)，包括 sORA21b、SSR Na10-B10、BoIAB20TR、FITO514、Apl1a 5pr，對二倍體植物而言 multiple allele 的資料在未進行進一步的遺傳分析以決定基因座的歸屬以之前，無法適用於分析軟體中分析，因此捨棄這些分子標誌，其中 Apl1a 5pr 只在 kale 品種 Redbor 品種檢測到多對對偶基因。BN38A、FITO102、FITO400、FITO377、FITO067 等標誌因只擴增到一個對偶基因，並無多型性，因而不進一步使用；標誌 MB2、SSR Na12-A01 是產生雜訊過多影響判讀，不適採用 (圖一 f)。也有些標誌雖表現良好，但在少數受試樣品中檢測不到對偶基因，稱之為 null allele，使資料缺值無法分析而無法使用，如 MB5、OI10F12、FITO565。部分分子標誌在最高波峰左右均有跡痕條帶發生，可能造成鄰近異質結合條帶重

疊而造成誤判，因此將其定義為跡痕條帶表現異常，如 CALSSR、Ni4B10、OI12F2、OI12G4、OI10H4 而不採用（圖一 d）。BN72A 與 FITO353 均出現 addition of adenine 效應，此效應為 Tag DNA 聚合酶在進行 DNA 複製結束時，會自然於 DNA 序列最後增加一個腺嘌呤（adenine）的情形（圖一 a），在本試驗中預期 addition of adenine 效應完全，但由於 Tag DNA 聚合酶對每個標誌的引子反應不一，因此每個分子標誌的 addition of adenine 的效應也會不一，若 addition of adenine 效應不完全，所產生的波峰將可能影響到主要波峰，影響對偶基因之判讀，如 BN72A 的 addition of adenine 效應極不完全，波峰甚至超越主要波峰，嚴重影響結果之判讀（圖一 c）；而 FITO353 雖因此波峰成為三角型，但由於不影響對偶基因之判讀，以留使用。

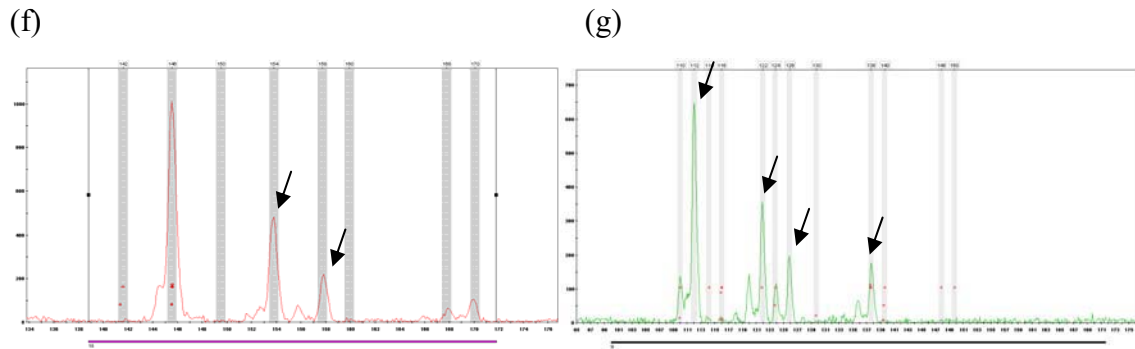




圖一、SSR 分子標誌之各種表現情形

Fig. 1 Different expressions of SSR markers in this study.

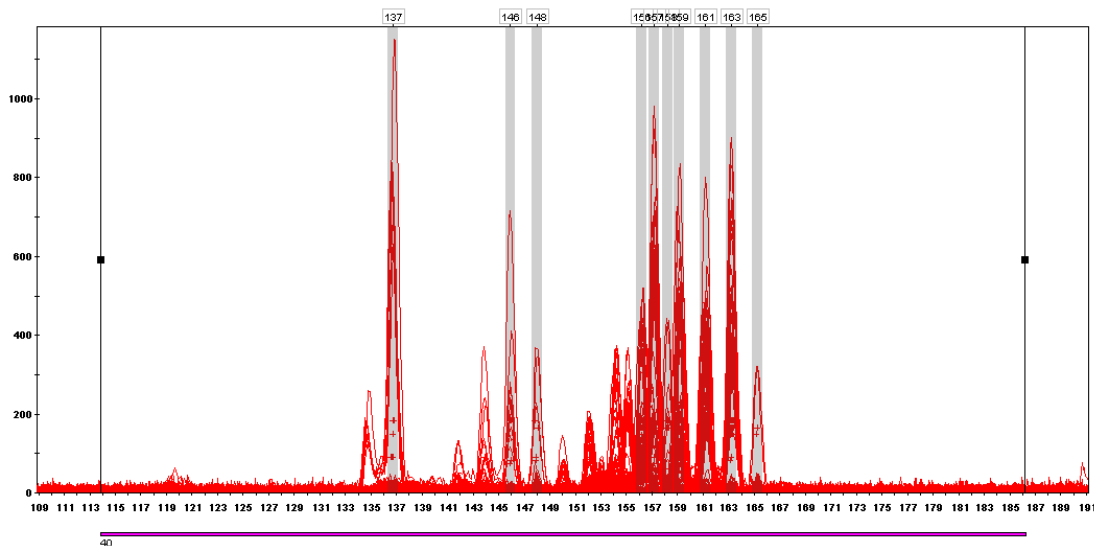
(a) 表現良好的標誌，箭頭 1 所指為 addition of adenine 效應不完全所產生之波峰。箭頭 2 所指為跡痕條帶的波峰。在表現良好的標誌中前者幾乎沒有，後者則適當表現。(b) 異質結合體的情形。(c) addition of adenine 效應極為不完全，因此使波峰呈現三角型。(d) 跡痕條帶表現異常，於主要條帶左邊及右邊均出現跡痕條帶，可能造成鄰近異質結合條帶重疊而造成誤判。(e) 擴增效果微弱之分子標誌，訊號微弱，無法與雜訊分辨，無法判讀。



圖一、續

Fig. 1 Continued.

(f) 雜訊，箭頭所指的波峰形狀與主波峰不同，且波峰高度不如主波峰，因此視為雜訊，過多雜訊可能會影響判讀。(g) Multiple allele，箭頭顯示 4 個波峰形狀相似，因此認定為同一標誌偵測到 4 個對偶基因。



圖二、標誌 Ol12D5 表現的 bin 情形。98 個樣本資料以 GeneMapper 4.0 軟體分析後重疊後所得結果。橫軸為 SSR 產物片段大小 (bp)，縱軸為螢光訊號強度。灰色區域代表對偶基因範圍 (bin)，上方數字為 bin 之名稱，亦即對偶基因之大小。下方桃色線段代表此分子標誌之多型性片段範圍。

Fig. 2 The bin expression of Marker Ol12D5.

2. 參試樣品之對偶基因檢測結果

剔除上述表現不良的分子標誌後，所篩選的 26 個 SSR 標誌分為 8 個 panel 進行 98 個樣本之對偶基因檢測，包括：MB1、Ol10F11、MB4、BN12A、BN83B1、sORA26、sORA43、BoCALb、SSR Na10-D03、BoDCTD1、SSR Na10-F06、BoREM1b、SSR Na12-A02、SSR Na12-A07、BoABI1、BoPC15、BoPLD1、BoCALa、BoCAM1、BoIAB19TF、BoPC34、BoIAB94TF、Ol12D5、FITO353、FITO043、FITO036。在所有分子標誌中，有 10 個標誌已被定位於 *B. oleracea* 9 對染色體中的其中 7 對染色體上，由於文獻搜尋時第二及第四染色體上所分佈之標誌於本次試驗均表現不良，因此無法達成每對染色體均至少分佈一個分子標誌的目標。

分子標誌的表現如圖二所示。在選用的 26 個 SSR 標誌基因座中，在 98 個樣品中所能檢測到最少的對偶基因數為 2 個對偶基因，由 MB1、Ol10F11、sORA26、BoPC34、BoIAB94TF、FITO036 等 6 個引子對檢測而得，最多對偶基因的基因座為 Ol12D5，有 12 個，平均每個基因座有 3.96 個對偶基因（表二）。Ol10F11 基因座在供試的 98 個品種中只有兩種變化，只能檢測到 2 種基因型，而最多的 Ol12D5 基因座有 27 種 type，平均每個 SSR 引子對可以區別出 6.92 個基因型。

由 26 個 SSR 標誌共獲得 103 個對偶基因（表三），其中有 6 個對偶基因普遍存在所有變種，即 Ol10F11-174、sORA26-108、Na10F06-126、Na12A02-186、BoCAM1-240、FITO043-197。有 17 個對偶基因只出現在特定變種，其中 sORA43-205 bp、BoCALa-251 bp 為芥藍特有的對偶基因，sORA43-203 bp、Na10-D03-203 bp、BoDCTD1-168 bp、SSR Na10-F06-141bp、BoCAM1-236 bp、Ol12D5-144 bp、Ol12D5-152 bp、FITO353-349 bp 共八個為甘藍特有，BN12A-311 bp、BoABI1-204 bp、BoIAB19TF-275 bp、BoIAB19TF-284 bp、BoIAB94TF-137 bp 為抱子甘藍特有，FITO043-196 bp 為花椰菜特有，FITO043-199 bp 為羽衣甘藍特有的對偶基因（表三）。

表三、各 SSR 基因座在甘藍類變種檢測之對偶基因及頻率

Table 3. Allele frequencies at 26 SSR loci in different varieties of *B. oleracea*.

marker	allele	芥藍 (n=21)	甘藍 (n=24)	抱子甘藍 (n=16)	青花菜 (n=11)	花椰菜 (n=21)	羽衣甘藍 (n=2)	青花筍 (n=2)	球莖甘藍 (n=1)
MB1	189	0.929	0.460				1.000		
	191	0.071	0.540	1.000	1.000	1.000		1.000	1.000
OI10F11	174	0.048	1.000	1.000	0.909	0.714	1.000	1.000	1.000
	179	0.952			0.091	0.286			
MB4	87		0.060			0.024			0.500
	94				0.182	0.429			
	98	1.000	0.780	0.844	0.818	0.595	1.000	1.000	
	100		0.160	0.156					0.500
BN12A	274	0.214	0.760	0.688	0.091				1.000
	311			0.313					
	313	0.786	0.240		0.591	1.000	1.000	0.500	
	315				0.318			0.500	
sORA26	108	0.952	0.960	0.750	1.000	0.143	0.500	1.000	1.000
	110	0.048	0.040	0.250		0.857	0.500		
sORA43	193		0.020	1.000					
	202	0.071	0.300		0.955	1.000	1.000	1.000	1.000
	203		0.120						
	205	0.929							
	207		0.560		0.045				
BN83B1	211		0.260	0.031	0.318	0.071	0.500		1.000
	212	0.976	0.060						
	216	0.024	0.180		0.682	0.929		1.000	
	220		0.500	0.969			0.500		
BoCALb	266		0.140	0.563	0.682	1.000	0.250	0.250	1.000
	268	1.000	0.700	0.063	0.318		0.750	0.750	
	270		0.160	0.375					
Na10-D03	176		0.740	0.656	0.909	0.881	0.750	1.000	0.500
	189	1.000	0.120	0.344	0.091	0.167	0.250		0.500
	203		0.140						
BoDCTD1	168		0.120						
	180	0.905	0.240		0.091	0.643	0.250		1.000
	189		0.540	0.500		0.095	0.250		
	191	0.095	0.100	0.500	0.909	0.310	0.500	1.000	
Na10-F06	126	0.548	0.320	0.375	0.682	0.952	0.500	0.500	1.000
	141		0.100						
	144	0.452	0.580	0.625	0.318	0.048	0.500	0.500	

表三、續

Table 3. continued.

marker	allele	芥藍 (n=21)	甘藍 (n=24)	抱子甘藍 (n=16)	青花菜 (n=11)	花椰菜 (n=21)	羽衣甘藍 (n=2)	青花筍 (n=2)	球莖甘藍 (n=1)
BoREM1b	193	0.619	0.040	0.969	0.045				
	196	0.238	0.960	0.031	0.864	0.976		1.000	0.500
	214	0.143			0.091	0.024	1.000		0.500
Na12-A02	186	0.595	0.640	0.250	0.909	0.095	0.250	1.000	0.500
	190	0.405	0.360	0.750		0.286	0.500		0.500
	192				0.091	0.619	0.250		
Na12-A07	176	0.048	0.020						
	178	0.762	0.440	0.969	0.227	0.786	1.000		0.500
	182	0.190	0.540	0.031	0.773	0.214		1.000	0.500
BoABI1	188		0.720		0.136	0.048			0.500
	192			0.375	0.045				
	198		0.040	0.219		0.024	0.750		
	200	1.000	0.200		0.227	0.571	0.250	0.500	0.500
	202		0.040		0.409	0.381		0.500	
	204			0.406					
	206				0.182	0.024			
BoPC15	200	0.952	0.260		0.364	0.929		0.500	0.500
	202	0.024	0.040		0.591	0.048	0.250	0.500	
	203				0.045				0.500
	206	0.024	0.680	0.844		0.024	0.750		
	208		0.020	0.156					
BoPLD1	289	1.000	0.220		0.136				
	296		0.560	1.000	0.864	1.000	0.500	1.000	
	298		0.220				0.500		1.000
BoCALa	231				0.409	0.786		0.500	
	233		0.400	0.750			0.500		1.000
	241		0.120	0.188		0.024			
	242					0.071	0.500		
	245	0.143	0.340	0.063		0.024			
	247	0.833	0.140		0.591	0.095		0.500	
	251	0.024							
BoCAM1	235	0.333	0.200	0.031			0.500		
	236		0.060						
	240	0.667	0.740	0.969	1.000	1.000	0.500	1.000	1.000

表三、續

Table 3. continued.

marker	allele	芥藍 (n=21)	甘藍 (n=24)	抱子甘藍 (n=16)	青花菜 (n=11)	花椰菜 (n=21)	羽衣甘藍 (n=2)	青花筍 (n=2)	球莖甘藍 (n=1)
BoIAB19TF	273				0.182	0.048			
	275			0.500					
	282	0.143	0.320		0.364	0.381		0.500	1.000
	283	0.857	0.680	0.188	0.455	0.571	1.000	0.500	
	284			0.313					
BoPC34	158	0.976	0.440	1.000	0.182			0.500	0.500
	162	0.024	0.560		0.818	1.000	1.000	0.500	0.500
BoIAB94TF	222		0.340	0.500	0.227	0.452	0.500	0.250	1.000
	224	1.000	0.660	0.500	0.773	0.595	0.500	0.750	
OI12D5	137			0.031					
	144		0.020						
	146		0.060	0.250		0.095			
	148		0.040			0.095			
	152		0.040						
	156	0.143		0.031		0.405			
	157	0.310	0.380		0.318	0.048	0.250		
	158			0.063		0.143			
	159	0.452				0.167	0.500		
	161	0.095	0.040	0.563			0.250		
	163		0.420	0.063	0.682	0.024		1.000	1.000
	165		0.020			0.024			
FITO353	343	0.357			0.909	0.048		0.500	1.000
	344			0.313			0.500		
	346		0.080						
	349		0.060						
	358	0.643	0.860	0.688	0.091	0.952	0.500	0.500	
FITO043	180	0.095	0.160						
	196					0.048			
	197	0.048	0.680	1.000	0.136	0.690	0.250	0.250	1.000
	199						0.250		
	203	0.857	0.160		0.864	0.262	0.500	0.750	
FITO036	214	0.095	0.320	0.125	0.091	0.375	0.500		1.000
	223	0.905	0.680	0.875	0.909	0.675	0.500	1.000	
Total allele	103	53	78	54	55	63	47	37	34
Fixed allele		6	1	6	3	7	9	15	18
變種特有		2	9	5	0	1	0	0	0

三、甘藍類各品種之遺傳歧異度與群集分析

將供試材料以 26 個 SSR 標誌擴增所得條帶資料以 Modified Roger's Distance (MRD) 估算 98 個品種的遺傳歧異度，同一變種內之各品種遺傳距離矩陣如表四所示。而任意品種之間的遺傳距離介於 0.098 至 0.8605 之間，平均的遺傳距離為 0.651 (資料未顯示)。

以 UPGMA 演算法進行分群，群集分析結果如圖三。參試 98 個品種的平均遺傳距離介於 0 至 0.738 之間，樹狀圖中顯示在遺傳距離 0.098 以上可清楚區分不同受試品種，且進行分群。在平均遺傳距離 0.738 時可將芥藍與其他供試材料分開。在平均遺傳距離 0.685 處其他材料又可分為兩群，分別是青花菜、花椰菜為一群，球莖甘藍、甘藍、抱子甘藍及羽衣甘藍為一群。青花菜及花椰菜在 0.604 處分開，‘日本-T1-168’紫花椰菜與青花菜同群，但在距離 0.515 處與青花菜分開，青花菜品種則大致分為兩群。花椰菜品種沒有明顯的分群，而以‘Early white’與‘雪玉 65 天’遺傳距離最小。平均遺傳距離 0.677 處可將羽衣甘藍與球莖甘藍、甘藍、抱子甘藍分開，於 0.653 處可將抱子甘藍分開，距離 0.645 處再將球莖甘藍區分。除了紅甘藍外，甘藍品種的平均遺傳距離為 0.568。所有材料群集分析結果可分為芥藍、青花菜、花椰菜、球莖甘藍 (1 個)、甘藍、抱子甘藍及羽衣甘藍 (2 個) 七群，兩個青花筍品種被分在青花菜群中。

供試之材料中，‘B-50 天青花’、‘B-70 天青花’、‘48 天花椰’三個品種均各有兩個單株進行 SSR 標誌的分析。結果顯示‘B-70 天青花’的兩個單株平均遺傳距離為 0，完全相同，符合期待。然而‘B-50 天青花’與‘48 天花椰’的兩個單株表現為不同的基因型，‘48 天花椰’單株-1 與單株-2 的平均遺傳距離達 0.22，‘B-50 青花’的單株-1 與單株-2 達 0.42。在黑芥藍以及抱子甘藍兩個 OP 品種的部分，供試的 16 個單株之間均呈現相當大的差異，黑芥藍單株間平均遺傳距離介於 0.098 至 0.41，抱子甘藍則為 0.31 至 0.49 之間 (表四)。

表四、變種內各品種以 Modified Roger's Distance (MRD) 估算之遺傳距離 (甘藍)

Table. 4 The genetic distance within varieties defined by Modified Roger's Distance (In cabbage)

	台農 104	初秋	春陽	夏之星	T-530	頂峰	春秋 1號	夏光	和風	陽光 45天	陽光 60天	陽光 52天	陽光 50天	好味	翠峰	新峰	輝峰	T-523	冬取	T-968	夏秋	高峰	純英	Takii 中生紅甘藍
台農 104																								
初秋		0.5189																						
春陽		0.5281	0.3397																					
夏之星		0.5460	0.5460	0.5718																				
T-530 甘藍		0.5718	0.5095	0.4903	0.4903																			
頂峰		0.4903	0.4274	0.4599	0.5460	0.5095																		
春秋 1 號		0.5000	0.2402	0.4043	0.5095	0.5633	0.4804																	
夏光		0.5281	0.5718	0.5281	0.5371	0.5718	0.5371	0.5547																
和風		0.6355	0.5000	0.5633	0.5460	0.5965	0.6202	0.5189	0.5718															
陽光 45 天		0.5965	0.5281	0.5460	0.5633	0.6124	0.5000	0.5633	0.4703	0.5371														
陽光 60 天		0.5095	0.4599	0.5460	0.5189	0.6045	0.5281	0.3922	0.5460	0.4804	0.5189													
陽光 52 天		0.5281	0.5460	0.5801	0.5095	0.6202	0.5371	0.4903	0.5189	0.5000	0.3101	0.4160												
陽光 50 天		0.6430	0.5460	0.5718	0.5547	0.5718	0.5371	0.5095	0.5965	0.5801	0.4804	0.4599	0.4494											
好味		0.5281	0.5371	0.4599	0.546	0.5718	0.5095	0.5189	0.4903	0.5281	0.5189	0.4703	0.4804	0.5281										
翠峰		0.5718	0.6124	0.5965	0.5547	0.6430	0.5718	0.5633	0.5000	0.5633	0.3669	0.5000	0.3536	0.5189	0.5189									
新峰		0.5965	0.5000	0.5547	0.5547	0.6124	0.5547	0.4804	0.546	0.5281	0.5281	0.4599	0.5000	0.4703	0.5281	0.5281								
輝峰		0.6355	0.5371	0.643	0.4804	0.6651	0.5189	0.5189	0.6045	0.5095	0.5801	0.4703	0.5371	0.5000	0.5883	0.4703								
T-523		0.5883	0.5000	0.5281	0.4703	0.4043	0.5718	0.5718	0.5189	0.4804	0.4903	0.5633	0.5460	0.5801	0.4903	0.5633	0.5460	0.5547						
冬取		0.5547	0.5281	0.5718	0.5189	0.5801	0.5460	0.4703	0.4599	0.5460	0.4494	0.4043	0.416	0.4599	0.4703	0.4274	0.3798	0.5371	0.5281					
T-968		0.6723	0.4903	0.5371	0.5281	0.4703	0.4903	0.5281	0.6430	0.5718	0.5547	0.5718	0.5281	0.5718	0.6045	0.4494	0.5460	0.5000	0.5281					
夏秋		0.5718	0.4160	0.3669	0.6279	0.6124	0.5095	0.4494	0.5371	0.4903	0.5095	0.5000	0.5189	0.5801	0.4160	0.5718	0.5189	0.5965	0.5371	0.5095	0.5460			
高峰		0.5883	0.2402	0.4043	0.5965	0.5000	0.3101	0.5883	0.4385	0.5095	0.4160	0.5281	0.5281	0.5000	0.5965	0.4385	0.4903	0.5000	0.4903	0.4703	0.3536			
純英		0.5883	0.4703	0.5000	0.6045	0.6202	0.5371	0.5095	0.6202	0.5000	0.5547	0.4903	0.6045	0.5000	0.5801	0.5718	0.5189	0.5000	0.5547	0.5460	0.5095	0.4043		
Takii 中生紅甘藍		0.6934	0.7003	0.7206	0.5095	0.6723	0.6794	0.6934	0.6045	0.6045	0.6430	0.5883	0.5965	0.6279	0.5883	0.6124	0.5371	0.5883	0.5883	0.6578	0.7338	0.6934	0.6578	

表四、續 (花椰菜)

Table. 4 continued. (culiflower)

	S-35 青梗	S-80 青梗	麗雪	H-50 花椰	白秀	嬌雪	日本 T1-168	M-48 花椰-1	M-48 花椰-2	S-45 青梗	39 天 花椰	愛玉	雪姬	Earlywhite	雪玉 65 天	芬雪	雪華	firstwhite	S-65 青梗
S-35 青梗	0.3252																		
S-80 青梗	0.3922	0.3669																	
麗雪	0.4385	0.5000	0.3922																
H-50 花椰	0.3536	0.3798	0.2594	0.5095															
白秀	0.4160	0.4160	0.2402	0.4160	0.3397														
嬌雪	0.5460	0.5095	0.5460	0.5718	0.5883	0.4903													
日本-T1-168	0.2594	0.3536	0.3669	0.4043	0.3397	0.4494	0.5547												
M-48 花椰-1	0.3397	0.4160	0.4274	0.4804	0.3798	0.5000	0.5801	0.2193											
M-48 花椰-2	0.3798	0.5095	0.4494	0.5189	0.4703	0.4599	0.5547	0.4385	0.3798										
45 天青梗	0.4599	0.5000	0.3922	0.4160	0.4703	0.4385	0.5801	0.3798	0.3101	0.4160									
39 天花椰	0.4494	0.3536	0.3922	0.5547	0.4494	0.4494	0.5281	0.4703	0.4160	0.3922	0.4385								
愛玉	0.4494	0.4274	0.3101	0.4804	0.3798	0.3101	0.5460	0.4903	0.4385	0.4043	0.3669	0.3101							
雪姬	0.5095	0.4274	0.3101	0.5189	0.3536	0.3798	0.5633	0.4599	0.4043	0.4599	0.3669	0.3397	0.3101						
Earlywhite	0.4903	0.4903	0.2942	0.5095	0.3101	0.3798	0.6045	0.4385	0.3798	0.4274	0.3536	0.3798	0.3252	0.1698					
雪玉 65 天	0.3798	0.4160	0.3536	0.5281	0.3669	0.3798	0.5547	0.4385	0.3798	0.3252	0.4274	0.3101	0.3397	0.3101					
芳雪	0.3397	0.3669	0.3669	0.5189	0.2942	0.4274	0.5801	0.3252	0.2402	0.3798	0.3922	0.3669	0.3669	0.3669	0.3252	0.2594			
雪華	0.5000	0.4494	0.5095	0.5801	0.5371	0.4599	0.5371	0.5547	0.5095	0.4703	0.5281	0.3397	0.3922	0.4385	0.4804	0.3798	0.4703		
firstwhite	0.4160	0.3397	0.2942	0.4903	0.3669	0.3536	0.5000	0.4274	0.3669	0.3669	0.3536	0.2193	0.2193	0.2193	0.2774	0.2594	0.2942	0.3536	

表四、續 (芥藍)

Table. 4 continued. (chinese kale)

	翠津	翠寶	慧津	芥 1	芥 2	芥 4	芥 5	芥 6	芥 7	芥 8	芥 9	芥 10	芥 11	芥 12	芥 13	芥 14	芥 15	芥 16	芥 17	永春	大豐
翠津	0.3669																				
翠寶	0.3922	0.4160																			
慧津	0.4903	0.5095	0.5633																		
芥 1	0.3922	0.4385	0.4903	0.3798																	
芥 2	0.4599	0.4385	0.4599	0.4043	0.3669																
芥 4	0.5460	0.4903	0.5633	0.4160	0.3536	0.3798															
芥 5	0.4599	0.4385	0.5189	0.4043	0.2774	0.3669	0.3536														
芥 6	0.4703	0.4274	0.5460	0.3669	0.2942	0.3252	0.3101	0.1698													
芥 7	0.4804	0.4599	0.5371	0.3798	0.3101	0.3101	0.3252	0.1961	0.1698												
芥 8	0.4804	0.4385	0.5547	0.3922	0.2942	0.3798	0.3397	0.2942	0.2942	0.1961											
芥 9	0.4903	0.4703	0.5883	0.4043	0.3669	0.3669	0.3536	0.2402	0.1387	0.1961	0.3252										
芥 10	0.4903	0.4903	0.5547	0.4043	0.3669	0.3101	0.3536	0.3101	0.2402	0.2774	0.3798	0.1961									
芥 11	0.4804	0.4160	0.5189	0.3536	0.3397	0.4160	0.3536	0.2774	0.2594	0.2774	0.2594	0.3101	0.3669								
芥 12	0.4903	0.4703	0.5965	0.4160	0.3798	0.3798	0.3669	0.2594	0.1387	0.2193	0.3397	0.0981	0.2193	0.3252							
芥 13	0.4804	0.4599	0.5000	0.3536	0.2774	0.2402	0.2942	0.2402	0.2193	0.2402	0.2942	0.2774	0.1961	0.3101	0.2942						
芥 14	0.4599	0.4385	0.4804	0.5095	0.3922	0.3397	0.4703	0.3669	0.3798	0.4385	0.4494	0.4274	0.3798	0.4599	0.4274	0.3397					
芥 15	0.4274	0.3536	0.4804	0.4043	0.2774	0.3397	0.3536	0.1961	0.2193	0.2774	0.2193	0.3101	0.3669	0.2402	0.3252	0.2774	0.3397				
芥 16	0.4804	0.4599	0.5460	0.3536	0.2774	0.3101	0.2942	0.2774	0.2193	0.2774	0.2193	0.3101	0.3397	0.3397	0.3252	0.2402	0.4160	0.2774			
芥 17	0.5281	0.4903	0.5000	0.5718	0.5460	0.5281	0.6045	0.5633	0.5883	0.5965	0.5801	0.6279	0.5965	0.5633	0.6355	0.5460	0.4903	0.5281	0.5801		
永春	0.4274	0.3922	0.4703	0.4804	0.4043	0.3536	0.4599	0.3798	0.3922	0.3798	0.3922	0.4274	0.4274	0.3798	0.4385	0.3798	0.2942	0.2942	0.4385	0.5000	
大豐																					

表四、續 (孢子甘藍)

Table. 4 continued. (Brussels sprouts)

	抱 1	抱 2	抱 3	抱 4	抱 5	抱 6	抱 7	抱 8	抱 9	抱 10	抱 11	抱 12	抱 13	抱 14	抱 15	抱 16
抱 1																
抱 2	0.3798															
抱 3	0.416	0.4703														
抱 4	0.3669	0.4043	0.416													
抱 5	0.3669	0.4274	0.4385	0.3397												
抱 6	0.3922	0.3798	0.3669	0.3669	0.3669											
抱 7	0.3922	0.4043	0.3669	0.3397	0.3669	0.3101										
抱 8	0.4385	0.4903	0.5189	0.5189	0.3922	0.4804	0.4385									
抱 9	0.5095	0.5189	0.5095	0.4703	0.5281	0.4903	0.4043	0.4703								
抱 10	0.416	0.4903	0.4804	0.5189	0.416	0.5	0.416	0.3101	0.4274							
抱 11	0.4494	0.4804	0.4043	0.4703	0.4494	0.4274	0.3252	0.4043	0.4494	0.416						
抱 12	0.4703	0.4599	0.4043	0.4903	0.4903	0.4043	0.3798	0.4903	0.5189	0.4903	0.4804					
抱 13	0.5095	0.5547	0.4494	0.5095	0.4043	0.4494	0.4274	0.3798	0.4903	0.416	0.4274	0.4599				
抱 14	0.546	0.4599	0.546	0.5281	0.546	0.4494	0.4703	0.5281	0.546	0.5371	0.4494	0.416	0.4804			
抱 15	0.546	0.4599	0.5633	0.3798	0.4903	0.4903	0.4043	0.5281	0.4385	0.4903	0.5	0.4385	0.5547	0.4599		
抱 16	0.5371	0.5281	0.5189	0.3922	0.4385	0.4385	0.416	0.5	0.5189	0.4903	0.4703	0.5633	0.416	0.4804	0.4703	



表四、續 (青花菜)

Table. 4 continued. (broccoli)

	B-50 青花-1	清華	B-50 青花-2	清華 二號	綠帝	B-70 青花-1	B-70 青花-2	永翠	天綠	翠翠	814 青花	B-45 青花
B-50 青花-1												
清華	0.5460											
B-50 青花-2	0.3922	0.4494										
清華二號	0.4903	0.3536	0.4274									
綠帝	0.4599	0.5000	0.4385	0.4385								
70 天青花-1	0.4274	0.4160	0.4043	0.4274	0.5000							
70 天青花-2	0.4274	0.4160	0.4043	0.4274	0.5000	0.0000						
永翠	0.5460	0.4160	0.5095	0.4274	0.4804	0.4599	0.4599					
天綠	0.5281	0.3922	0.5000	0.3397	0.5281	0.4385	0.4385	0.3922				
翠翠	0.5460	0.3252	0.4494	0.3922	0.4160	0.4274	0.4274	0.2942	0.3922			
814 青花	0.4385	0.4160	0.4043	0.4274	0.4804	0.3252	0.3252	0.4599	0.4385	0.3669		
B-45 青花	0.4903	0.4160	0.2774	0.4385	0.4903	0.4160	0.4160	0.4385	0.4494	0.3669	0.3397	

表四、續 (羽衣甘藍、青花筍)

Table. 4 continued. (kale, broccolini)

	kalewinterbor	kaleredbor		綠優	元氣
kalewinterbor			綠優		
kaleredbor	0.6355		元氣	0.3798	

四、甘藍類各品種之主座標分析 (Principal Coordinate Analysis, PCoA)

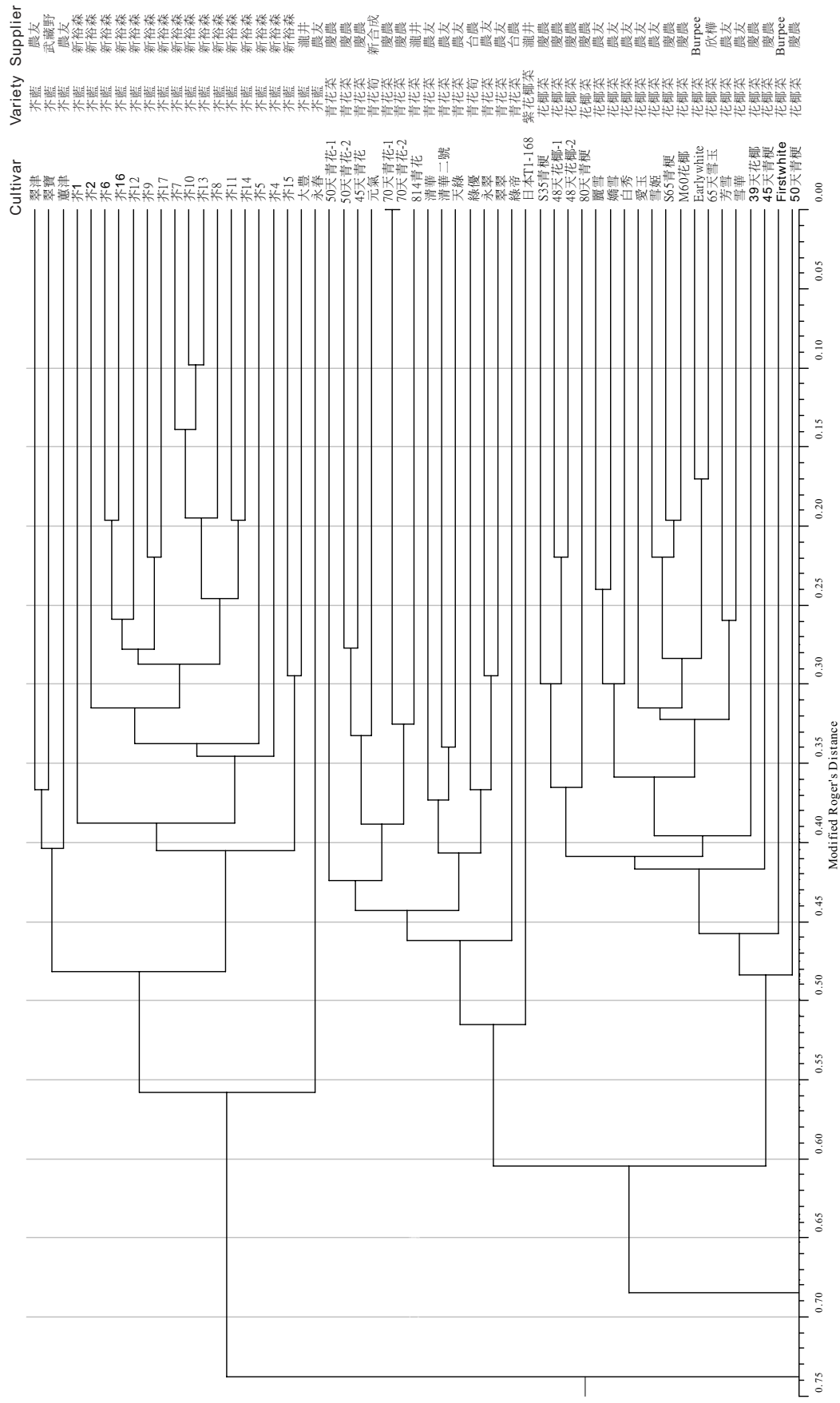
主座標分析結果顯示前三個主座標解釋量分別為 14.03 %、10.40 % 以及 6.78 %。以第一主座標與第二主座標繪製之二維平面分佈圖，可顯示各變種間的平面距離關係，將所有受試品種分為五群，分別為芥藍、花椰菜、甘藍、青花菜、抱子甘藍 (圖四)。青花筍分佈於青花菜群內，羽衣甘藍與球莖甘藍則分布近甘藍群。然而分析結果顯示各變種的品種間差異甚大，以致各變種有分群重疊情形而使分群不明確，除抱子甘藍與芥藍分群明顯，其餘各變種無明顯界線。

前三個主座標累積的解釋量占總變異的 31.21 %，所繪製之三維空間座標圖與二維平面的分佈相似，亦分成芥藍、花椰菜、甘藍、青花菜、抱子甘藍等五群 (圖五)。

五、甘藍類變種間遺傳歧異度與群集分析與主座標分析

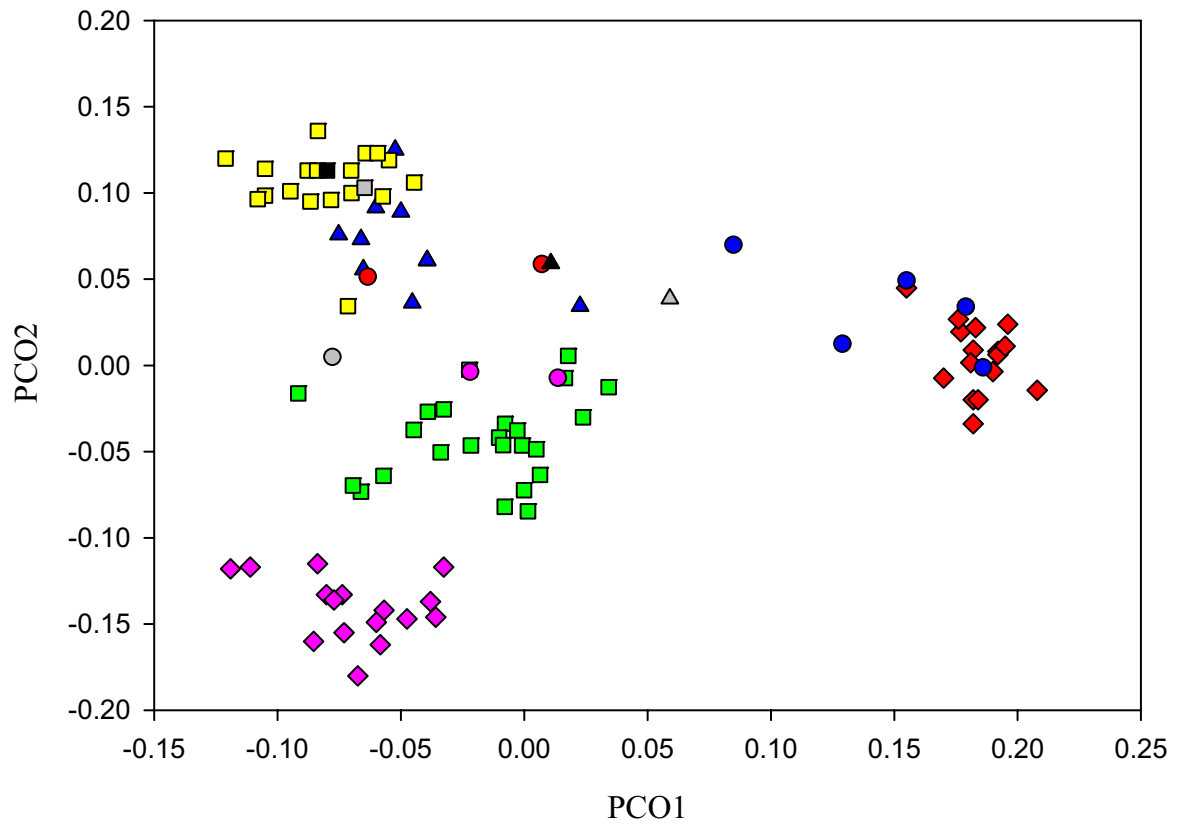
將所有受試材料以 8 個變種表示，每個變種視為一個資料點，進行變種間遺傳歧異度與群集分析。分析結果顯示芥藍與其他變種間關係較遠，平均距離為 0.623，球莖甘藍則在 0.596 處首先被分開，0.553 及 0.516 處則分別將抱子甘藍及羽衣甘藍分開，花椰菜則在 0.455 先與甘藍、青花菜、青花筍分開，甘藍則與青花菜青花筍聚集在 0.427 處，青花菜與青花筍的平均遺傳距離則為 0.197。本主座標分析的前三個主座標解釋量分別為 41.5 %、26.8 % 以及 16.99 %，占總變異量的 85.29 %。





圖三、甘藍類蔬菜品種利用 26 個 SSR 分子標誌所得之 UPGMA 樹狀圖，橫軸為 Modified Roger' s Distance 之遺傳距離

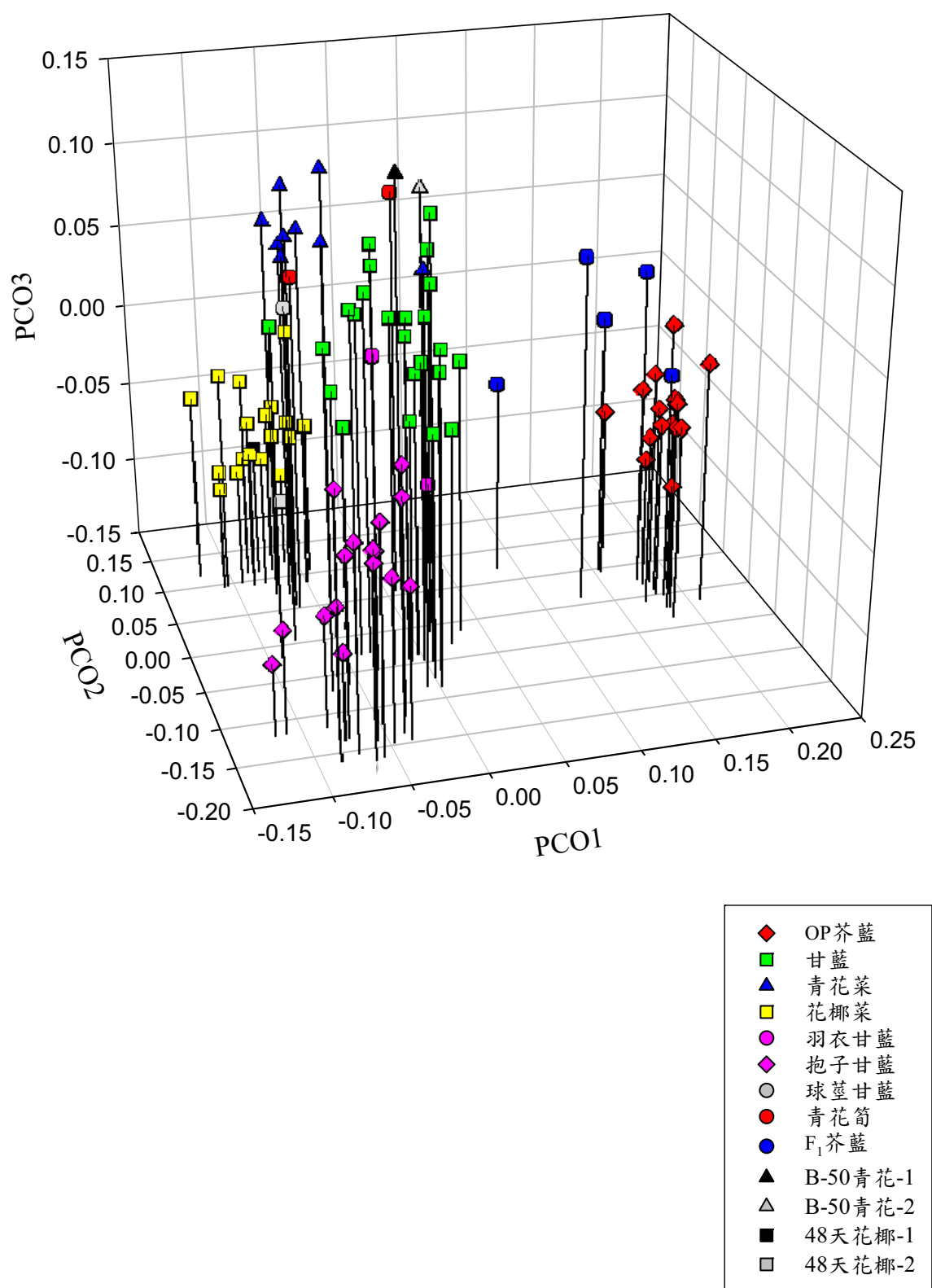
Fig . 3 UPGMA dendrogram of 98cultivars of *Brassica oleracea* tested by 26 SSR markers, genetic distance is defined by Modified Roger' s Distance.



- ◆ OP芥藍
- 甘藍
- ▲ 青花菜
- 花椰菜
- 羽衣甘藍
- ◆ 抱子甘藍
- 球莖甘藍
- 青花筍
- F_1 芥藍
- ▲ B-50青花-1
- △ B-50青花-2
- 48天花椰-1
- 48天花椰-2

圖四、甘藍類蔬菜品種以 26 個 SSR 標誌分析結果之主座標分析二維圖

Fig. 4 Two-dimension PCoA analysis of cultivars of *B. oleracea* by 26 SSR markers.



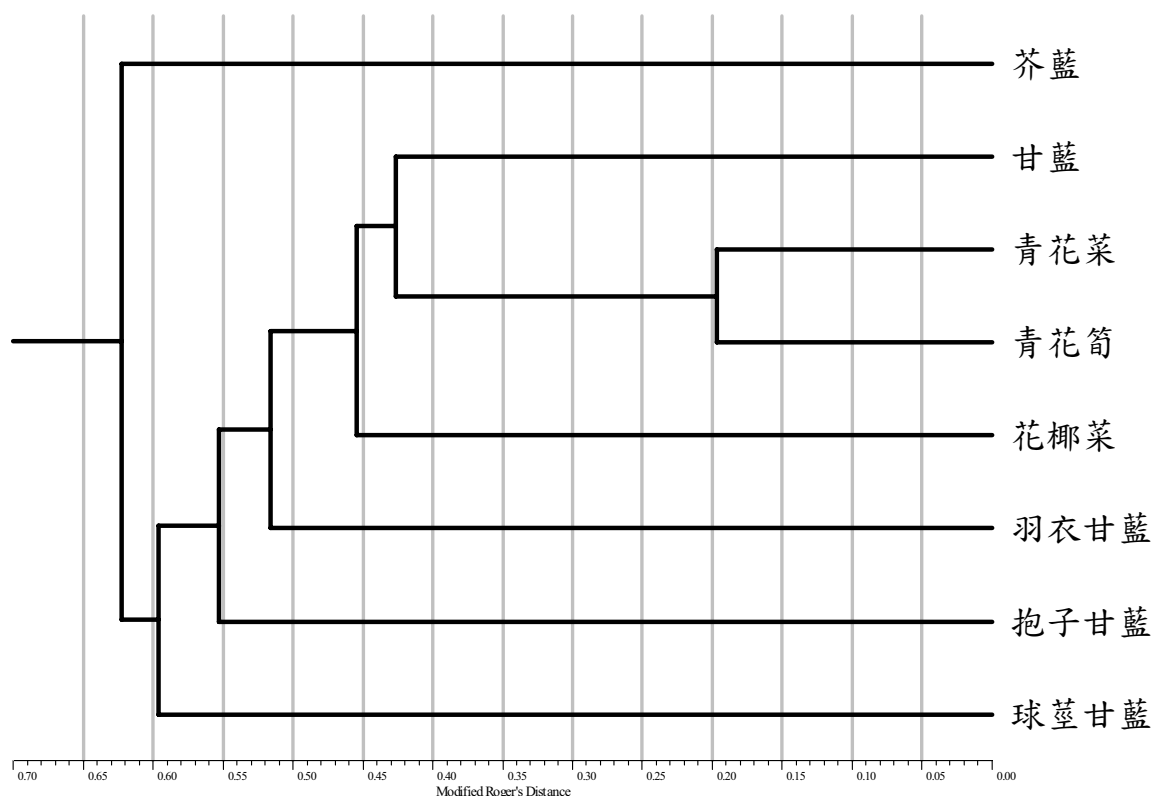
圖五、甘藍類蔬菜品種以 26 個 SSR 標誌分析結果之主座標分析三維圖

Fig. 5 Three-dimension PCoA analysis of cultivars of *B. oleracea* by 26 SSR markers.

表五、甘藍類各變種以 Modified Roger's Distance (MRD) 估算之遺傳距離

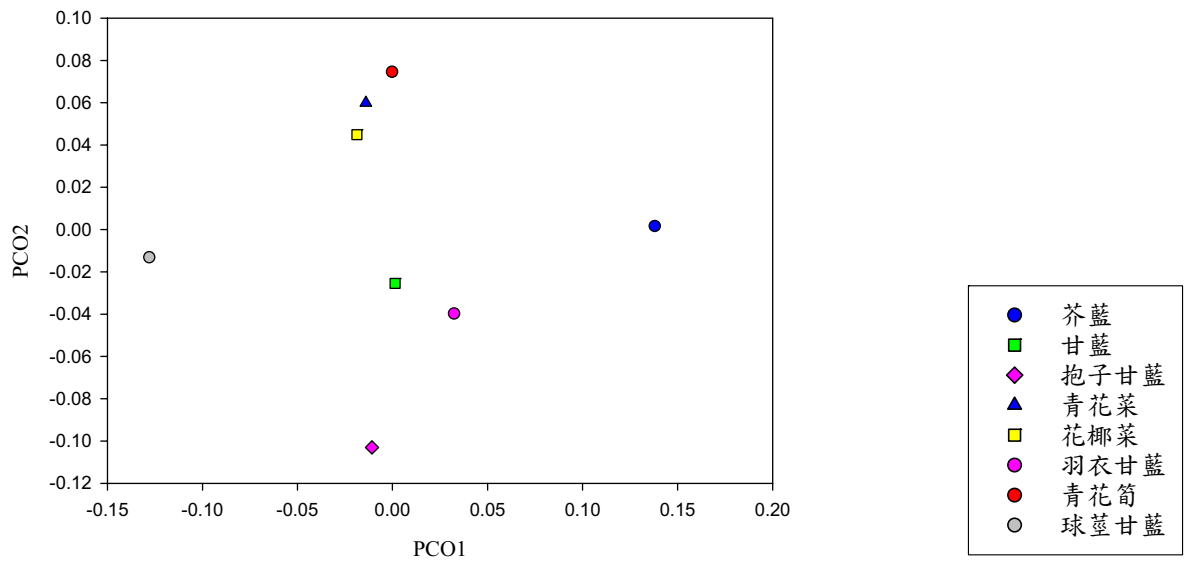
Table 5 Genetic distance between varieties defined by Modified Roger's Distance based on allele frequencies at 26 SSR loci in different varieties.

	芥藍	甘藍	抱子甘藍	青花菜	花椰菜	羽衣甘藍	青花筍	球莖甘藍
芥藍	0							
甘藍	0.5368	0						
抱子甘藍	0.6591	0.4348	0					
青花菜	0.5967	0.4234	0.5853	0				
花椰菜	0.6339	0.4837	0.5882	0.4198	0			
羽衣甘藍	0.5837	0.4410	0.5528	0.5298	0.5168	0		
青花筍	0.6153	0.4297	0.6023	0.1968	0.4602	0.5760	0	
球莖甘藍	0.7326	0.5267	0.6334	0.5611	0.5945	0.6355	0.6260	0



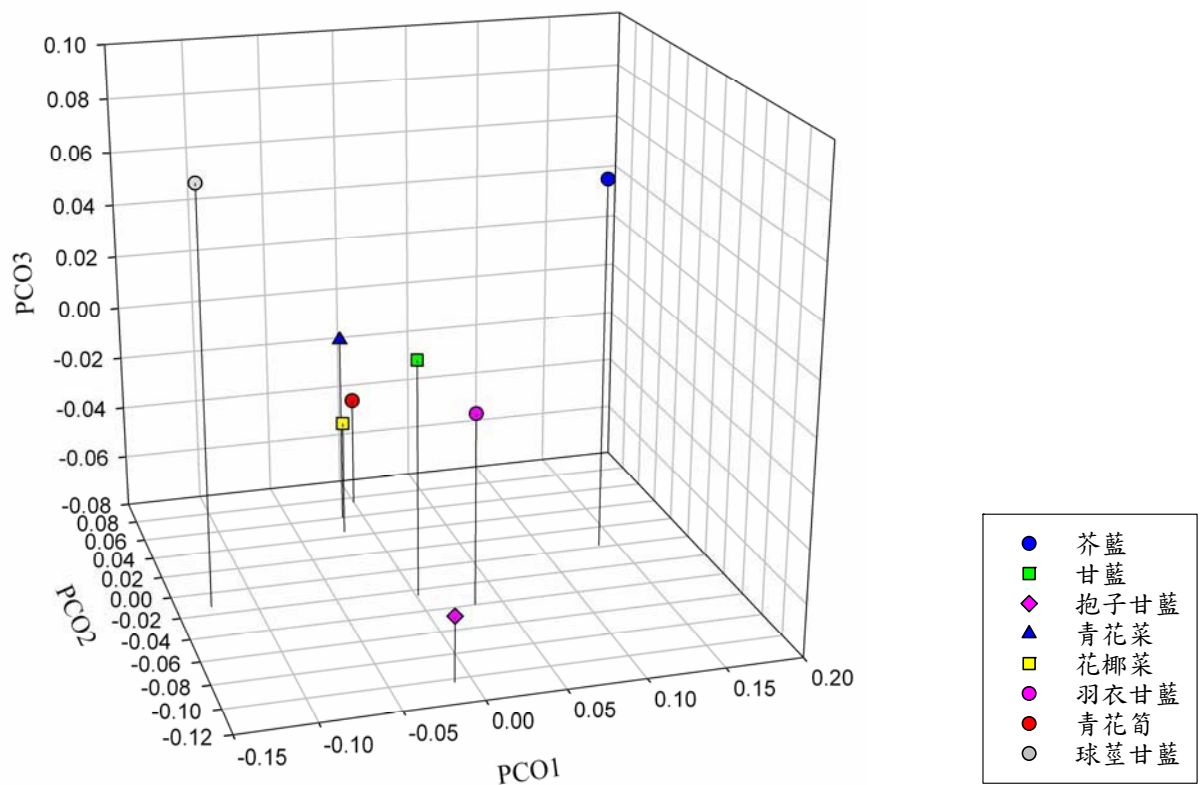
圖六、以遺傳距離矩陣所繪製 7 個甘藍類變種之 UPGMA 群集分析樹狀圖，橫軸為 Modified Roger's Distance 之遺傳距離

Fig. 6 UPGMA dendrogram of seven variety of Brassica oleracea and broccolini. Genetic distance is defined by Modified Roger's Distance.



圖七、甘藍類 7 個變種及青花筍以 26 個 SSR 標誌分析結果之主座標分析二維圖

Fig. 7 Two-dimension PCoA analysis of seven varieties of *B. oleracea* and broccolini by 26 SSR markers.



圖八、甘藍類 7 個變種及青花筍以 26 個 SSR 標誌分析結果之主座標分析三維圖

Fig. 8 Three-dimension PCoA analysis of seven varieties of *B. oleracea* and broccolini by 26 SSR markers.



第五章、討論

有關於甘藍類蔬菜 (cole crops) 的分類的起源與演化一直以來都是學者感興趣的研究，因為甘藍類蔬菜遺傳資源豐富，加上長久以來人為的選拔馴化，使種內變異情形更形複雜。也因各種不同分類方法，如植物學分類、型態分類、園藝性狀分類等造成甘藍類蔬菜的命名複雜且不一致，常有誤用或同一變種有不同命名之情形。針對 *B. oleracea* 的分類研究，一般將甘藍類蔬菜分成甘藍、青花菜、花椰菜、球莖甘藍、抱子甘藍、羽衣甘藍、芥藍等 7 個變種。

本試驗的群集分析結果 (圖三) 以及主座標分析的結果 (圖四、五) 可將所有品種分為 7 個類群且與預期的七個栽培變種相符合。

群集分析結果將品種分為 (1)芥藍 (2)青花菜、花椰菜 (3)甘藍、抱子甘藍、球莖甘藍與羽衣甘藍三大群，這與 Song 等人 (1988b) 利用 RFLP 對芸薹屬 *C. genome* 作物進行分群的結果略有差異，該研究將 *B. oleracea* 中食用蔬菜的部分為三個群組，(1)芥藍 (2)花椰菜、甘藍、球莖甘藍 (3)青花菜、抱子甘藍、羽衣甘藍類。由本研究的結果，花椰菜與青花菜、甘藍、球莖甘藍、羽衣甘藍、抱子甘藍、芥藍各品種之間 MRD 遺傳距離的平均值分別為 0.606、0.679、0.665、0.677、0.731、0.757，以各變種為單位的 MRD 遺傳距離也以青花菜與花椰菜之間距離較為相近。說明花椰菜與青花菜間的遺傳距離最小，分群結果也將花椰菜與青花菜分在同一群中，顯示青花菜與花椰菜的親緣關係較近，這與過去由植物形態特徵的研究結果較相符合，且過去研究認為花椰菜可能來自青花菜 (Crisp, 1982; Gray, 1982)，近年來亦有利用 RAPD 與 ISSR 分子標誌研究佐證花椰菜與青花菜的關係較近，而與甘藍較遠 (Lu et al., 2009)。本次試驗唯一的紫花椰菜品種‘日本 T1-168’在群集分析中介於花椰菜與青花菜之間，這與孫等人 (2002) 以 AFLP 分子標誌對白色花椰菜、紫色花椰菜以及青花菜的親緣關係研究結果相同。‘日本 T1-168’紫花椰菜在陳 (2007) 的報告顯示紫花椰菜與白花椰菜具有很大的遺傳差異，但是白花椰菜反而與青花菜聚集在同一類群中。在‘日本 T1-168’的品種性狀調查結果中，觀察到該品種花球形成的初始階段，花球顏色為綠色，且花球型態與青花菜極為相像，在花球發育的中期才轉為紫色。

關於芥藍是否為 *B. oleracea* 的一個變種亦曾備受爭議。由於芥藍與其他甘藍類蔬菜相比較為耐熱且早熟，又分為白花與黃花品種，與其他甘藍類變種多為黃花的情形不同，這使得美國園藝學家 Bailey (1922) 最早將芥藍視為一個種

(*Brassica alboglabra* Bailey) (Vaughan, 1977)，也造成芥藍的分類上具有爭議性。然而芥藍的染色體數與甘藍類相同 ($n=9$)，且彼此雜交容易成功。劉與關 (1998) 以幼苗型態觀察、同功異構酶、雜交結果率等研究結果，認為芥藍與其他甘藍類蔬菜有密切的關係。本研究分群的結果顯示芥藍與其他變種差異較大，Song 等人以 RFLP 的研究認為芥藍在演化上地位可能較為古老，可能與 *B. oleracea* L. var. *ramosa* DC. (thousand headed kale) 的演化地位相近，也證明芥藍未脫離甘藍類的範圍。群聚分析的結果‘Takii 中生紅甘藍’與其他甘藍被分為不同群集中，‘Takii 中生紅甘藍’與其他甘藍品種的 RMD 遺傳距離平均值高達 0.642，顯示有極大的遺傳差異。與其他變種相比，球莖甘藍與甘藍的親緣關係較為相近。

從主座標分析以及群聚分析結果可以發現本次試驗變種內各品種分佈情形分散，使各變種間群聚情形不明顯，常有重疊之現象。利用表四所整理之對偶基因出現頻率，將各類型內的所有品種視為一個族群，以 8 個族群為單位計算各族群間的遺傳距離，並進行分群分析與主座標分析，分群結果與利用品種間個別的遺傳距離計算的分群結果有所出入。此結果可能由於取樣太少，造成變種內的各個品種差異性過大，因此使機差 (error) 大於樣品取樣平均數，且由於甘藍類作物各變種間可互相雜交，又經人為育種雜交，因此使變種間界線模糊。此結果顯示常應用於栽培作物的種以下分類單位在遺傳的角度並不明確，且對一般作物而言，變種的定義多以外表型進行評估分類，部分商業品種在其育種程序中，亦可能藉由與其他變種間雜交以導入某特定性狀之情形存在，如花椰菜有時會利用青花菜導入耐熱之特性，或亦可能經由其他屬導入農藝性狀，如雄不稔特性等。因此利用分子標誌進行品種鑑定或純度鑑定時可能會有過度敏感或與實用目的不符合等問題存在。

本次試驗包含抱子甘藍與黑芥藍兩個 OP 品種，抱子甘藍 16 個單株之間 RMD 遺傳距離的平均值為 0.454，最大值及最小值分別為 0.563 及 0.310。黑芥藍平均值則為 0.316，最大值及最小值分別為 0.509 及 0.098。兩個 OP 品種的 16 個單株之間差異甚大。主座標分析的結果也顯示抱子甘藍各單株的群聚情形極為分散，相較之下黑芥藍的分布較為集中。

Muhammet 等人 (2004) 以 13 個 SSRs 區分甘藍、花椰菜、青花菜 3 個變種的 54 個品種，可將 49 個品種區分開來，Louarn (2007) 則是以 11 個分子標誌區分包括青花菜、花椰菜、一般甘藍、紅甘藍、皺葉甘藍、抱子甘藍等變種之 59 個品種，

可區分 51 個品種。兩者所使用的分子標誌平均 PIC 值分別為 0.64 以及 0.56，因此可有效率地區分品種。雖然本次試驗可將 95 個品種完全區分，但是使用分子標誌多達 26 組，平均 PIC 值為 0.54，其中有 11 組的 PIC 值在 0.5 以下，所能提供的資訊較少。因此若只使用其中 15 組 PIC 值在 0.5 以上的分子標誌，即應有足夠區別力將所有品種分開。

青花菜品種‘B-70 天青花’的兩個單株之 SSR 標誌結果可認定為相同遺傳背景，然而青花菜‘B-50 天青花’及花椰菜‘48 天花椰’的各兩個單株表現不同遺傳背景，且‘48 天花椰’-1 與‘48 天花椰’-2 的平均遺傳距離達 0.22，‘B-50 青花’-1 與‘B-50 青花’-2 之遺傳距離達 0.42，顯示 F_1 品種內存在異質性。從‘48 天花椰’-1 與‘48 天花椰’-2 表現的基因型，在大部分的 SSR 基因座上表現相同，然 SSR Na12-A07 基因座上，‘48 天花椰’單株-1 的基因型為異質結合 BC (材料編號 7，附錄三)，單株-2 為同質結合 BB (材料編號 8，附錄三)。在 BoIAB19TF 基因座上兩單株表現分別為 CC 及 DD，但實際上 C、D 兩對偶基因只相差 1 bp。

‘B-50 青花’的兩單株，有 13 個基因座完全相同，1 個完全不同。而其於的 12 個基因座上，可以發現在兩單株的基因型中，必有一個等位基因相同，其中在單株-1 (材料編號 22，附錄三) 上有 8 個基因座呈現同質結合，4 個為異質結合，單株-2 (材料編號 23) 則呈為 3 個基因座呈現同質結合，9 個為異質結合。顯示第一個單株基因座中的對偶基因有被固定的趨勢，且此單株的同質結合基因座多達 20 個，占 26 個基因座中的 76.9%，而於第二單株的同質結合基因座占 57.7%，推測有可能為該品種在生產雜交品種時建立的親本自交系，但由於有時為了維持生長勢，無法達成完全自交的目的，而只能以兄妹交的途徑，也因此無法達成在各基因座完全同質結合的情形。

甘藍類蔬菜多採用孢子體型自交不親合性進行雜交種子生產，以獲得雜種優勢，並避免自交，然而自交不親合性的強弱受到環境因素影響，如遇高溫或濕度過高即可能降低自交不親合性，而可能產生自交種子。在‘B-50 青花’的單株-1 的高度同質結合情形極有可能因此造成。

在許多雜交作物的研究上顯示除了 OP 品種，甚至是 F_1 品種均有一定比例的異質性，以油菜研究為例 (Tommasini et al., 2003)，以 10 個品種中各 48 個單株進行純度檢定，主座標分析結果明顯具有品種之間各個單株互相重疊的情形發生，無法將每個單株均分派至正確的品種分布中。品種內植株變異性高會阻礙分子標

誌在品種間的鑑別力，導致無法利用此系統偵測任何品種確實的基因型。此異質性可能存在多種原因，其中之一可能由於甘藍類作物為異交作物，在建立親本自交系時常因自交弱勢之限制，無法產生真正同質結合的親本，而維持一定程度的異質性，因而使生產的 F₁ 品種仍產生 marker 分離的情形。

在進行品種內一致性檢測時，一致性的程度亦受到所選用的分子標誌以及參試品種的影響，因此需考慮使用適當數目的分子標誌。

本次試驗發現 4 個具雄不稔特性之品種，包括青花菜品種‘清華’與‘清華二號’，以及青花筍品種‘綠優’及‘元氣’，其中‘清華’與‘清華二號’兩個品種經分子標誌檢測確認為 Ogura 細胞質雄不稔 (Cytoplasmic male sterility, CMS)。Ogura CMS 為 1968 年由日本的 Hiroshi Ogura 在位於鹿兒島的日本蘿蔔採種田中選育而得 (Ogura, 1968)，經長久研究證實不稔性主要由粒線體控制，細胞質雄不稔的發生與粒線體的 orf138 鑲嵌基因 (chimeric gene) 密切相關 (Bonhomme et al., 1991; Bonhomme et al., 1992; Krishnasamy and Makaroff, 1993)。雄不稔特性為生產雜交種子最為經濟、有效的途徑，在採種上的運用越來越重要，因此若能將此材料善加利用將可節省大量成本。

在品種園藝性狀調查結果的部分，由於本次試驗中大多數品種所選定播種及定植的時間並未依照一般建議適期進行，加上育苗期間因植物生長箱持續低溫以及定植後氣溫高低變化極大，造成許多品種的成熟期與品種提供單位所記述的成熟性差異甚大，另外也由於栽培行株距過於密集，使株型縮小，花球、葉球均無預期大，且栽培後期平均氣溫逐漸上升，造成部分青花菜品種花球黃化、花椰菜品種抽薹後消蕾的情形發生，本調查結果突顯以外表型進行品種鑑定之限制。

結論

以 26 個簡單序列重複分子標誌分析甘藍類蔬菜，可將參試的 65 個品種，98 份材料進行區分，並且將參試材料區分為甘藍、青花菜、花椰菜、球莖甘藍、抱子甘藍、羽衣甘藍、芥藍等七個類群，其中青花筍被歸至青花菜類。從遺傳距離以及群集分析結果認為花椰菜與青花菜親緣關係較近，而芥藍雖與其他變種差異較大，但仍屬於甘藍類作物變種之一。試驗結果顯示參試的兩個 OP 品種，其品種內各單株間變異甚大，相對而言，部分 F_1 品種具高度一致性，但部分亦存在異質性，若欲達成將分子標誌實際應用於品種鑑定的目標，需再針對品種內存在的變異性做進一步的掌握。





參考文獻

- 台灣地區現有作物栽培品種名錄十字花科篇。1994。行政院農業委員會台灣省農業試驗所特刊 43 號。
- 洪立、黃涵、嚴新富。1992。蔬菜名彙集。國立台灣大學園藝系。臺北。
- 孫德嶺、趙前程、宋文芹、陳瑞陽。2002。花椰菜類蔬菜自交系基因組間親緣關係的 AFLP 分析。園藝學報。29(1):72-74。
- 陳怡婷。2004。以簡單重複序列分子標誌探討花椰菜品種及白菜類的遺傳變異。國立台灣大學園藝學研究所碩士論文。
- 張連宗。1998。台灣十字花科蔬菜品種改良。十字花科蔬菜產業發展研討會專刊。農業委員會。2005。台灣農家要覽-農作篇(二)。豐年社。台北市。
- 劉海濤、關佩聰。1998。芥藍的分類學研究。華南農業大學學報 19:82-86。
- 譚冠寧、藍永慶、李麗淑、趙坤、何海旺、蔣菁。2007。青花筍(西蘭莖)新品種桑甜 2 號。中國蔬菜 10:63~64。
- Anderson, J.A., G.A. Churchill, J.E. Autrique, S.D. Tanksley, and M.E. Sorrells. 1993. Optimizing parental selection for genetic-linkage maps. *Genome* 36:181-186.
- Ayele, M., B.J. Haas, N. Kumar, H. Wu, Y.L. Xiao, S. Van Aken, T.R. Utterback, J.R. Wortman, O.R. White, and C.D. Town. 2005. Whole genome shotgun sequencing of *Brassica oleracea* and its application to gene discovery and annotation in *Arabidopsis*. *Genome Res* 15:487-495.
- Babula, D., M. Kaczmarek, P.A. Ziolkowski, and J. Sadowski. 2007. *Brassica oleracea*, p. 227-285. In: C. Kole.(ed). *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants - vegetable*. Vol. Volume 5.ed. Springer Berlin Heidelberg. New York.
- Blair, M., H.F. Buendia, M. Giraldo, I. Metais, and D. Peltier. 2008. Characterization of AT-rich microsatellites in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 118:91-103.
- Bonhomme, S., F. Budar, M. Ferault, and G. Pelletier. 1991. A 2.5 kb NcoI fragment of *Ogura* radish mitochondria DNA is correlated with cytoplasmic male sterility in *Brassica* cybrids. *Curr. Genet.* 19:121-127.
- Bonhomme, S., F. Budar, D. Lancelin, I. Small, M.C. Defrance, and G. Pelletier. 1992. Sequence and transcript analysis of the Nco2.5 *Ogura* specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in *Brassica* cybrids. *Mol. Gen. Genet.* 235:340-348.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic-linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms.

- Am. J. Hum. Genet. 32:314-331.
- Bouhadida, M., A.M. Casas, M.J. Gonzalo, P. Arus, M.A. Moreno, and Y. Gogorcena. 2009. Molecular characterization and genetic diversity of *Prunus* rootstocks. *Sci. Hortic.* 120:237-245.
- Boutin-Ganache, I., M. Raposo, M. Raymond, and C.F. Deschepper. 2001. M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *BioTechniques* 31:24-+.
- Bredemeijer, G.M.M., R.J. Cooke, M.W. Ganai, R. Peeters, P. Isaac, Y. Noordijk, S. Rendell, J. Jackson, M.S. Roder, K. Wendehake, M. Dijcks, M. Amelaine, V. Wickaert, L. Bertrand, and B. Vosman. 2002. Construction and testing of a microsatellite database containing more than 500 tomato varieties. *Theor. Appl. Genet.* 105:1019-1026.
- Burgess, B., H. Mountford, C.J. Hopkins, C. Love, A.E. Ling, G.C. Spangenberg, D. Edwards, and J. Batley. 2006. Identification and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers derived in silico from *Brassica oleracea* genome shotgun sequences. *Mol. Ecol. Notes* 6:1191-1194.
- Camargo, L.E.A., L. Savides, G. Jung, J. Nienhuis, and T.C. Osborn. 1997. Location of the self-incompatibility locus in an RFLP and RAPD map of *Brassica oleracea*. *J. Hered.* 88:57-60.
- Coelho, R.C., M.A. Faria, J. Rocha, A. Reis, M. Oliveira, and E. Nunes. 2009. Assessing genetic variability in germplasm of *Phaseolus vulgaris* L. collected in Northern Portugal. *Sci. Hortic.* 122:333-338.
- Crisp, P. 1982. The use of an evolutionary scheme for cauliflowers in the screening of genetic resources. *Euphytica* 31:725-734.
- Dixon, G.R. 2007. Vegetable brassicas and related crucifers. ed. CABI Pub., Cambridge, MA.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Figdore, S.S., M.E. Ferreira, M.K. Slocum, and P.H. Williams. 1993. Association of RFLP markers with trait loci affecting clubroot resistance and morphological characters in *Brassica oleracea* L. *Euphytica* 69:33-44.
- Fukino, N., Y. Yoshioka, N. Kubo, M. Hirai, M. Sugiyama, Y. Sakata, and S. Matsumoto. 2008. Development of 101 novel SSR markers and construction of an SSR-based genetic linkage map in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Breed. Sci.* 58:475-483.
- Gao, M.Q., G.Y. Li, B. Yang, D. Qiu, M. Farnham, and C. Quiros. 2007. High-density *Brassica oleracea* linkage map: identification of useful new linkages. *Theor. Appl. Genet.* 115:277-287.

- Ghislain, M., J. Nunez, M. del Rosario Herrera, J. Pignataro, F. Guzman, M. Bonierbale, and D.M. Spooner. 2009. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Mol. Breed.* 23:377-388.
- Gray, A.R. 1982. Taxonomy and evolution of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Econ. Bot.* 36:397-410.
- Gupta, S.K. 2009. Biology and breeding of crucifers.ed. CRC Press, Boca Raton.
- Hale, A. and M.W. Farnham. 2005. A comparative study of SRAP, AFLP, and SSR markers for detecting genetic differences among elite broccoli inbreds. *HortScience* 40:998-999.
- Hancock, J.F. 2004. Plant evolution and the origin of crop species.ed. CABI Pub., New York, NY.
- Hayashi, K., K. Shimazu, H. Yaegaki, M. Yamaguchi, H. Iketani, and T. Yamamoto. 2008. Genetic diversity in fruiting and flower-ornamental Japanese apricot (*Prunus mume*) germplasms assessed by SSR markers. *Breed. Sci.* 58:401-410.
- Hayden, M.J., T.M. Nguyen, A. Waterman, and K.J. Chalmers. 2008a. Multiplex-ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics* 9:80.
- Hayden, M.J., T.M. Nguyen, A. Waterman, G.L. McMichael, and K.J. Chalmers. 2008b. Application of multiplex-ready PCR for fluorescence-based SSR genotyping in barley and wheat. *Mol. Breed.* 21:271-281.
- Howell, E.C., G.C. Barker, G.H. Jones, M.J. Kearsey, G.J. King, E.P. Kop, C.D. Ryder, G.R. Teakle, J.G. Vicente, and S.J. Armstrong. 2002. Integration of the cytogenetic and genetic linkage maps of *Brassica oleracea*. *Genetics* 161:1225-1234.
- Iniguez-Luy, F.L., L. Lukens, M.W. Farnham, R.M. Amasino, and T.C. Osborn. 2009. Development of public immortal mapping populations, molecular markers and linkage maps for rapid cycling *Brassica rapa* and *B. oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* 120:31-43.
- Iniguez-Luy, F.L., A.V. Voort, and T.C. Osborn. 2008. Development of a set of public SSR markers derived from genomic sequence of a rapid cycling *Brassica oleracea* L. genotype. *Theor. Appl. Genet.* 117:977-985.
- Jahangir, M., H.K. Kim, Y.H. Choi, and R. Verpoorte. 2009. Health-Affecting Compounds in Brassicaceae. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety* 8:31-43.
- Karagyozev, L., I.D. Kalcheva, and V.M. Chapman. 1993. Construction of random small insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. *Nucleic Acids Res.* 21:3911-3912.
- Kays, S.J. and J.C.S. Dias. 1995. Common names of commercially cultivated vegetables

- of the world in 15 languages. *Econ. Bot.* 49:115-152.
- Kearsey, M.J., L.D. Ramsay, D.E. Jennings, D.J. Lydiate, E.J.R. Bohuon, and D.F. Marshall. 1996. Higher recombination frequencies in female compared to male meioses in *Brassica oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* 92:363-367.
- Kennard, W.C., M.K. Slocum, S.S. Figdore, and T.C. Osborn. 1994. Genetic analysis of morphological variation in *Brassica oleracea* using molecular markers. *Theor. appl. genet.* 87:721-732.
- Khattak, J.Z.K., J.L. Christiansen, A.M. Torp, and S.B. Andersen. 2007. Genic microsatellite markers for discrimination of spinach cultivars. *Plant Breed.* 126:454-456.
- Kianian, S.F. and C.F. Quiros. 1992. Generation of a *Brassica oleracea* composite RFLP map - linkage arrangements among various populations and evolutionary implications. *Theor. Appl. Genet.* 84:544-554.
- Kimura, T., M. Yagi, C. Nishitani, T. Onozaki, Y. Ban, and T. Yamamoto. 2009. Development of SSR Markers in Carnation (*Dianthus caryophyllus*). *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 78:115-123.
- Kong, Q., C. Xiang, Z. Yu, C. Zhang, F. Liu, C. Peng, and X. Peng. 2007. Mining and charactering microsatellites in *Cucumis melo* expressed sequence tags from sequence database. *Mol. Ecol. Notes* 7:281-283.
- Kresovich, S., A.K. Szewcmcfadden, S.M. Blik, and J.R. McFerson. 1995. Abundance and characterization of simple-sequence repeat (SSRs) Isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* (rapeseed). *Theor. Appl. Genet.* 91:206-211.
- Krishnasamy, S. and C.A. Makaroff. 1993. Characterization of the radish mitochondrial *orfB* locus - possible relationship with male sterility in Ogura radish. *Curr. Genet.* 24:156-163.
- Kushad, M.M., A.F. Brown, A.C. Kurilich, J.A. Juvik, B.P. Klein, M.A. Wallig, and E.H. Jeffery. 1999. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *J. Agric. Food Chem.* 47:1541-1548.
- Lacis, G., I. Rashal, S. Ruisa, V. Trajkovski, and A.F. Iezzoni. 2009. Assessment of genetic diversity of Latvian and Swedish sweet cherry (*Prunus avium* L.) genetic resources collections by using SSR (microsatellite) markers. *Sci. Hortic.* 121:451-457.
- Lagercrantz, U., H. Ellegren, and L. Andersson. 1993. The abundance of various polymorphic microdatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* 21:1111-1115.
- Lai, Y.L. and F.Z. Sun. 2003. The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. *Mol. Biol. Evol.* 20:2123-2131.

- Landry, B.S., N. Hubert, R. Crete, M.S. Chang, S.E. Lincoln, and T. Etoh. 1992. A genetic map for *Brassica oleracea* based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance genes to race-2 of *plasmodiophora Brassicae*. *Genome* 35:409-420.
- Lazaro, A. and I. Aguinagalde. 1998a. Genetic diversity in *Brassica oleracea* L. (Cruciferae) and wild relatives ($2n = 18$) using isozymes. *Ann. Bot.* 82:821-828.
- Lazaro, A. and I. Aguinagalde. 1998b. Genetic diversity in *Brassica oleracea* L. (Cruciferae) and wild relatives ($2n = 18$) using RAPD markers. *Ann. Bot.* 82:829-833.
- Leroy, X.J., K. Leon, and M. Branchard. 2000. Characterisation of *Brassica oleracea* L. by microsatellite primers. *Plant Syst. Evol.* 225:235-240.
- Li, G., M. Gao, B. Yang, and C.F. Quiros. 2003. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping. *Theor. Appl. Genet.* 107:168-180.
- Li, M.F., X.Q. Zheng, Y.Q. Zhu, X.S. Wang, S.Y. Liang, L. Li, and X.R. Wu. 2006. Development and characterization of SSR markers in lychee (*Litchi chinensis*). *Mol. Ecol. Notes* 6:1205-1207.
- Louarn, S., A.M. Torp, I.B. Holme, S.B. Andersen, and B.D. Jensen. 2007. Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in *Brassica oleracea*. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54:1717-1725.
- Lowe, A.J., A.E. Jones, A.F. Raybould, M. Trick, C.L. Moule, and K.J. Edwards. 2002. Transferability and genome specificity of a new set of microsatellite primers among *Brassica* species of the U triangle. *Mol. Ecol. Notes* 2:7-11.
- Lowe, A.J., C. Moule, M. Trick, and K.J. Edwards. 2004. Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in *Brassica* crop species. *Theor. Appl. Genet.* 108:1103-1112.
- Lu, X.J., L.W. Liu, Y.Q. Gong, L.P. Zhao, X.Y. Song, and X.W. Zhu. 2009. Cultivar identification and genetic diversity analysis of broccoli and its related species with RAPD and ISSR markers. *Sci. Hortic.* 122:645-648.
- Ma, K.H., J.G. Kwag, W.G. Zhao, A. Dixit, G.A. Lee, H.H. Kim, I.M. Chung, N.S. Kim, J.S. Lee, J.J. Ji, T.S. Kim, and Y.J. Park. 2009. Isolation and characteristics of eight novel polymorphic microsatellite loci from the genome of garlic (*Allium sativum* L.). *Sci. Hortic.* 122:355-361.
- Mansfield, D.C., A.F. Brown, D.K. Green, A.D. Carothers, S.W. Morris, H.J. Evans, and A.F. Wright. 1994. Automation of genetic linkage analysis using fluorescent microsatellite markers. *Genomics* 24:225-233.
- Metais, I., B. Hamon, R. Jalouzot, and D. Peltier. 2002. Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated

- from a genomic enriched library. *Theor. Appl. Genet.* 104:1346-1352.
- Miller, M.P. 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm> (July 10, 2010)
- Morales, M., V. Decker, and L. Ornella. 2010. Analysis of genetic diversity in Argentinian heterotic maize populations using molecular markers. *Cien. Inv. Agr.* 37:151-160.
- Moriguchi, K., C. Kimizuka-Takagi, K. Ishii, and K. Nomura. 1999. A genetic map based on RAPD, RFLP, isozyme, morphological markers and QTL analysis for clubroot resistance in *Brassica oleracea*. *Breed. Sci.* 49:257-265.
- Nguyen, H.T. and X. Wu. 2005. Molecular marker systems for genetic mapping, p. 23-52. In: K. Meksem and G. Kahl (eds.). *The handbook of plant genome mapping*. ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Ogura, H. 1968. Studies on the new male-sterility in Japanese radish, with special reference to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. *Memoirs of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University* 6:39-78.
- Ostrander, E.A., P.M. Jong, J. Rine, and G. Duyk. 1992. Construction of small - insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *P Natl Acad Sci USA* 89:3419-3423.
- Phippen, W.B., S. Kresovich, F.G. Candelas, and J.R. McFerson. 1997. Molecular characterization can quantify and partition variation among genebank holdings: A case study with phenotypically similar accessions of *Brassica oleracea* var capitata L (cabbage) 'Golden Acre'. *Theor. Appl. Genet.* 94:227-234.
- Portis, E., I. Nagy, Z. Sasvari, A. Stigel, L. Barchi, and S. Lanteri. 2007. The design of *Capsicum* spp. SSR assays via analysis of in silico DNA sequence, and their potential utility for genetic mapping. *Plant Sci.* 172:640-648.
- Reif, J.C., A.E. Melchinger, X.C. Xia, M.L. Warburton, D.A. Hoisington, S.K. Vasal, G. Srinivasan, M. Bohn, and M. Frisch. 2003. Genetic distance based on simple sequence repeats and heterosis in tropical maize populations. *Crop Sci* 43:1275-1282.
- Rodriguez-Plaza, P., R. Gonzalez, M.V. Moreno-Arribas, M.C. Polo, G. Bravo, J.M. Martinez-Zapater, M.C. Martinez, and A. Cifuentes. 2006. Combining microsatellite markers and capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence to identify the grape (*Vitis vinifera*) variety of musts. *Eur. Food Res. Technol.* 223:625-631.
- Rohlf, F.J. 2008. NTSYSpc: Numerical Taxonomy System. Exeter Publishing, Ltd., Setauket, NY.

- Schlotterer, C. and D. Tautz. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* 20:211-215.
- Sebastian, R.L., E.C. Howell, G.J. King, D.F. Marshall, and M.J. Kearsey. 2000. An integrated AFLP and RFLP *Brassica oleracea* linkage map from two morphologically distinct doubled-haploid mapping populations. *Theor. Appl. Genet.* 100:75-81.
- Simko, I. 2009. Development of EST-SSR Markers for the Study of Population Structure in Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Hered.* 100:256-262.
- Slocum, M.K., S.S. Figdore, W.C. Kennard, J.Y. Suzuki, and T.C. Osborn. 1990. Linkage arrangement of restriction-fragment-length-polymorphism loci in *Brassica oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* 80:57-64.
- Smith, L.B. and G.J. King. 2000. The distribution of BoCAL-a alleles in *Brassica oleracea* is consistent with a genetic model for curd development and domestication of the cauliflower. *Mol. Breed.* 6:603-613.
- Song, K.M., T.C. Osborn, and P.H. Williams. 1988a. Brassica taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPS) 1. Genome evolution of diploid and amphidiploid species. *Theor. Appl. Genet.* 75:784-794.
- Song, K.M., T.C. Osborn, and P.H. Williams. 1988b. Brassica taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPS) .2. preliminary analysis of subspecies within *Brassica rapa* (syn campestris) and *Brassica oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* 76:593-600.
- Stagel, A., E. Portis, L. Toppino, G.L. Rotino, and S. Lanteri. 2008. Gene-based microsatellite development for mapping and phylogeny studies in eggplant. *BMC genomics* 9:357-370.
- Szewc-McFadden, A.K., S. Kresovich, S.M. Bliet, S.E. Mitchell, and J.R. McFerson. 1996. Identification of polymorphic, conserved simple sequence repeats (SSRs) in cultivated *Brassica species*. *Theor. Appl. Genet.* 93:534-538.
- Tantasawat, P., J. Trongchuen, T. Prajongjai, W. Seehalak, and Y. Jittayasothorn. 2010. Variety identification and comparative analysis of genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) using morphological characters, SSR and ISSR analysis. *Sci. Hortic.* 124:204-216.
- Tommasini, L., J. Batley, G.M. Arnold, R.J. Cooke, P. Donini, D. Lee, J.R. Law, C. Lowe, C. Moule, M. Trick, and K.J. Edwards. 2003. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theor. Appl. Genet.* 106:1091-1101.
- Tonguc, M. and P.D. Griffiths. 2004. Genetic relationships of *Brassica* vegetables determined using database derived simple sequence repeats. *Euphytica*

- 137:193-201.
- Tsukazaki, H., H. Fukuoka, Y.S. Song, K.I. Yamashita, T. Wako, and A. Kojima. 2006. Considerable heterogeneity in commercial F1 varieties of bunching onion (*Allium fistulosum*) and proposal of breeding scheme for conferring variety traceability using SSR markers. *Breed. Sci.* 56:321-326.
- Tsunoda, S., K. Hinata, and C. Gómez-Campo. 1980. *Brassica crops and wild allies : biology and breeding*. ed. exclusive distributor ISBS, Forest Grove, Or.
- U, N. 1935. Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japan. J. Bot* 7:389-452.
- Vaughan, J.G. 1977. Multidisciplinary study of taxonomy and origin of *Brassica* crops. *Bioscience* 27:35-40.
- Watcharawongpaiboon, N. and J. Chunwongse. 2008. Development and characterization of microsatellite markers from an enriched genomic library of cucumber (*Cucumis sativus*). *Plant Breed.* 127:74-81.
- Westman, A.L. and S. Kresovich. 1998. The potential for cross-taxa simple-sequence repeat (SSR) amplification between *Arabidopsis thaliana* L. and crop brassicas. *Theor. Appl. Genet.* 96:272-281.
- Westman, A.L. and S. Kresovich. 1999. Simple sequence repeat (SSR)-based marker variation in *Brassica nigra* genebank accessions and weed populations. *Euphytica* 109:85-92.
- Xu, P., X.H. Wu, B.G. Wang, Y.H. Liu, D.H. Qin, J.D. Ehlers, T.J. Close, T.T. Hu, Z.F. Lu, and G.J. Li. 2010. Development and polymorphism of *Vigna unguiculata* ssp *unguiculata* microsatellite markers used for phylogenetic analysis in asparagus bean (*Vigna unguiculata* ssp *sesquipedialis* (L.) Verdc.). *Mol. Breed.* 25:675-684.
- Yamagishi, H. and T. Terachi. 1997. Molecular and biological studies on male-sterile cytoplasm in the Cruciferae .4. Ogura-type cytoplasm found in the wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Plant Breed.* 116:323-329.
- Yamagishi, H. and T. Terachi. 2001. Intra- and inter-specific variations in the mitochondrial gene orf138 of Ogura-type male-sterile cytoplasm from *Raphanus sativus* and *Raphanus raphanistrum*. *Theor. Appl. Genet.* 103:725-732.
- Yang, H., M.W. Sweetingham, W.A. Cowling, and P.M.C. Smith. 2001. DNA fingerprinting based on microsatellite-anchored fragment length polymorphisms, and isolation of sequence-specific PCR markers in lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Mol. Breed.* 7:203-209.

附錄

附錄一、甘藍類蔬菜參試品種可量化性狀調查一覽表

Appendix 1. The investigate of quantified characters of the cultivars of *B. oleracea*.

品種	採收期 (定植後)	株高 (cm)	株型	葉綠素 計讀值	葉長 (cm)	葉寬 (cm)	節數	莖徑 (mm)	播種 日期	播種至 結球天數	定植至 結球天數
45 天青花菜 (B-45)	早生(約 45 天)	15	小	52.2	20	15.5	13	17.75	1/16	69	13
50 天青花菜 (B-50)	中早生(約 50 天)	17	中	60.8	16	15	17	21.14	12/10	83	8
70 天青花菜 (B-70)	晚生	30	大	53.9	24	20.5	19	27.50	1/16	93	37
綠帝青花菜	中晚生(冬季專用)	27	大	57.1	25	17	19	27.14	1/16	108	52
814 青花菜		18	中	60.1	19	15.5	13	13.85	2/26		
清華	早生(約 52 天)	15.5	中	63.7	16.5	15.5	14	28.00	12/14	88	17
清華二號	早生(播種後約 75 天)	36	大	58.5	21.2	15.2	18	30.60	1/16	92	36
翠翠	早生(約 57 天)	23	中	58.9	20	17	15	20.57	2/14	86	33
永翠	早生(播種後約 78 天)			50.3					1/16		
天綠	早生(約 57 天)	19	中	58.5	18	14	16	18.50	1/16	101	45
永春		25		55.8	19	18	12	19.02	2/14	72	19
翠津	播種至採收 45~60 天	26	中	54.9	14	13.7	14	11.35	12/10	74	-1
蕙津		33	中	59.9	17.3	12.6	14	12.34	12/10	73	-2
翠寶		21	中	51.6	11.5	12.3	11	11.66	12/10	70	-5
大豐		27	高	62.9	23.5	15	10	14.20	2/26	61	20
OP 黑芥藍		35	高	52.5	17.5	15	13	15.52	12/14	127	21
元氣青花菜筍	播種後約 60~85 天	26	中	55.3	17.5	14	17	21.95	1/16	100	44
綠優青花菜筍	播種後約 60~80 天	24	中	62.7	14	15	14	20.41	12/14	79	8
日本-T 1-168		35	特大	56.4	22.5	14.2	22	19.87	1/16	98	42
39 天花椰	早生(約 39 天)	14	小	38.4	14.2	10	14	11.77	2/14	64	11
45 天青梗 (S-45)	早生(約 45 天)			50					3/5		
65 天青梗 (S-65)	晚生(約 65 天)			53					3/5		
35 天青梗 (S-35)	早生	10	中	48.7	15.5	12	10	7.34	12/10	77	2
80 天青梗 (S-80)	中晚生(約 80 天)	9.5	大	57.2	22.5	16.3	15	15.56	12/14	107	36
48 天花椰 (M-48)	中早生	13.5	小	51.4	17.5	11.5	14	9.34	12/10	58	-17
50 天花椰 (H-50)	中早生	12	小	50.7	10.5	8	14	7.10	1/16	87	31
60 天花椰 (M-60)	中生			52.4							
雪玉 65 天 (鬆花)	約 65 天	12.5	中	54.9	21	14.7	12	10.44	2/14		
愛玉	中生(播種後 80~85 天)	13	中	56.1	23.5	16	13	16.83	2/14	97	44
雪華	早生(約 45 天)			53.4					3/5		
雪姬	中生(約 75 天)	9	中	47.7	20.5	14.5	14	17.50	2/14	84	31
麗雪	中早生(約 65 天)	14	小	49.5	13	9	14	13.37	12/14	79	8

附錄一、續

Appendix 1 continued.

品種	採收期 (定植後)	株高 (cm)	株型	葉綠素 計讀值	葉長 (cm)	葉寬 (cm)	節數	莖徑 (mm)	播種 日期	播種至 結球天數	定植至 結球天數
嬌雪	早生(約 50 天)	9	中	49.3	17.2	12.8	19	12.92	1/16	76	20
芳雪		21	中	43.6	18.5	9.7	11	9.14	2/26	59	18
白秀	早生(40 天或 60 天)	10	中	50.4	18	12	13	12.98	1/16	80	24
Early white	52 天	11	中	57.7	24	17	14	12.62	2/26		
first white	50 天			44.4					3/5		
陽光 45 天甘藍	早生(約 45 天)	7.5	中	45.9	15.5	16.5	11	11.42	1/16	80	24
陽光 50 天甘藍	早生(約 50 天)	5.5	中	43.8	13.5	12	14	12.41	1/16	81	25
陽光 52 天甘藍	早生(約 52 天)	7	小	50.9	15	16	16	13.97	1/16	75	19
陽光 60 天甘藍	早生(約 60 天)	6.5	大	47	19	20	14	16.97	1/16	75	19
台農 104 甘藍	中晚熟(約 70 天)	6	中	66.4	21.3	22.5	20	13.53	12/10	92	17
好味甘藍	中生(約 60-65 天)	3.5	小	50	15	16	12	12.96	1/16	80	24
T-530 甘藍		5	中	48.2	21	21.5	15	16.44	1/16	75	19
T-968 甘藍		6		46.4	20	19	15	13.38	2/26	67	26
冬取甘藍		8		52.9	21.5	21	14	19.43	2/14		
T-523 甘藍		9		53	18.5	19	15	19.17	2/26		
夏秋	中生(約 60 天)	5.5	中	55	17	16.5	20	8.16	1/16	75	36
高峰	早生(約 50 天)	6	中	50.7	18.5	16	14	14.51	2/14	73	27
和風	早生(約 53 天)	11	中	53.5	17	19	19	14.28	1/16	75	19
夏光	早生(約 45 天)	6.5	小	66.8	17	16.5	20	10.54	12/10	92	17
新峰	早生(約 50 天)	9	大	54.1	22	23.5	19	15.70	2/14		
翠峰	早生(約 55 天)	11	中	50	26	27.5	15	14.22	2/14	73	27
輝峰	晚生(播種後 75~85 天)	12	中	55.9	22	21	17	17.83	2/14	75	29
頂峰	晚生(播種後 70~80 天)	6	大	49	16.5	18	16	12.03	1/16	80	24
純英	晚生(播種後 100 天)	10	大	54.2	23	23	15	16.81	2/14	73	27
初秋	極早生(約 55 天)	9	中	56.2	19.5	18	23	12.12	12/14	88	17
夏之星	中生(約 60-65 天)	9.3	中	52.8	22.5	21	16	10.49	12/14	101	13
春陽	中生(約 65 天)	5.5	中	53.5	19	20.5	17	11.19	12/14	89	18
Takii 中生紅甘藍	中生(約 80 天)	13	中	52.7	19	15	11	12.27	2/26		
春秋 1 號	中生(約 60 天)	10	中	57.6	18	20	25	8.51	12/10	92	17
winner		3.8	大	58.7	27	17.5	12	9.03	12/14	135	64
抱子甘藍	早生	17	大	38.7	14	13	18	13.32	2/14	-	-
kale winterbor	65 天	19	中	41.7	17.5	13	16	9.63	2/26	-	-
kale redbor	65 天	7	中	33.4	14	9.5	12	6.95	2/26	-	-

附錄二、甘藍類蔬菜參試品種園藝性狀一覽表

Appendix 2. Horticulture characters of the cultivars of *B. oleracea*.

品種	葉型	花球直徑	球形	球色	花色	內葉彎曲
日本-T 1-168	狹倒卵型	39.73		紫色	黃	不彎曲
39 天花椰		58.3	梅花型		消蕾	
45 天青梗 (S-45)						
65 天青梗 (S-65)						
35 天青梗 (S-35)	狹倒卵型	50	圓形		黃	不彎曲
80 天青梗 (S-80)	狹倒卵型	67.79	橢圓	象牙白	被吃	彎曲
48 天花椰 (M-48)	狹倒卵型		圓形		黃	不彎曲
50 天花椰 (H-50)	狹倒卵型	30.4		白	被吃	微彎
60 天花椰 (M-60)						
雪玉 65 天(鬆花)	倒卵型					不彎曲
愛玉	倒卵型	48.02		象牙白		不彎曲
雪華						
雪姬	倒卵型	25		白		不彎曲
麗雪	狹倒卵型	65.74	圓形	象牙白	黃	不彎曲
嬌雪	狹倒卵型	110.0	圓形	象牙白	黃	彎曲
芳雪	狹倒卵型			象牙白	消蕾	微彎曲
白秀	狹倒卵型		圓形	象牙白		不彎曲
Early white F1	倒卵型		圓型	白		不彎曲
first white						

附錄二、續

Appendix 2. continued.

品種	葉型	花球直徑	球形	球色	花色	備註
45 天青花菜 (B-45)	狹倒卵型	80			黃	
50 天青花菜 (B-50)	倒卵型	72.7	梅花型		黃	
70 天青花菜 (B-70)	倒卵型	71.71			黃	消蕾
綠帝青花菜	倒卵型	52.98	橢圓		黃	消蕾
814 青花菜	狹倒卵型					
清華	狹倒卵型	130	正圓形		黃	消蕾，Ogura CMS
清華二號	倒卵型	118.54	圓		黃	消蕾，Ogura CMS
翠翠	倒卵型	60.98	橢圓		黃	
永翠						
天綠	狹倒卵型	75			黃	消蕾
元氣青花菜筍		80	橢圓		黃	消蕾，雄不稔
綠優青花菜筍		31.73	扁橢圓		黃	雄不稔

附錄二、續

Appendix 2. continued.

品種	葉面	節間寬	花色
永春	皺縮	2.08	白
翠津	平滑	1.86	白
蕙津	微卷	2.38	白
翠寶	皺縮	1.91	白
大豐	微卷	2.7	白
OP 黑芥藍	微卷	2.69	白

附錄二、續

Appendix 2 continued.

品種	葉型	葉中肋寬	主脈色	球型	葉球色	球重(g)
陽光 45 天甘藍	圓型	凸出 中	白	圓球	黃綠	160
陽光 50 天甘藍	寬卵形	平板 中	淺綠	圓球	綠	300
陽光 52 天甘藍	橫寬橢圓形	凸出 中	淺綠	圓球	綠	-
陽光 60 天甘藍	圓型	凸出 中	白	圓球	綠	500
台農 104 甘藍	寬橢圓形	凸出 中	白	扁圓	綠	750
好味甘藍	寬卵形	凸出 中	淺綠	扁圓	濃綠	-
T-530 甘藍	圓型	凸出 中	白	扁圓	淺綠	
T-968 甘藍	橫寬橢圓形					
冬取甘藍	寬卵形	凸出 中	淺紫			
T-523 甘藍	橫寬橢圓形	凸出 中	淺紫			
夏秋	寬卵形	扁平 中	白	扁圓	淺綠	300
高峰	橫寬橢圓形	凸出 中	淺紫			
和風	寬橢圓形	凸出 大	白	扁圓	綠	200
夏光	寬卵形	凸出 中	淺綠	圓錐	黃綠	500
新峰	橫寬橢圓形	凸出 大	淺紫	扁圓	淺綠	
翠峰	橫寬橢圓形	凸出 大	白			
輝峰	寬橢圓形	凸出 中	白			
頂峰	圓型	凸出 中	白	扁圓		250
純英	寬卵形	凸出 大	白			
初秋	寬卵形	凸出 中	白	扁圓	淺綠	390
夏之星	寬橢圓形	扁平 中	白	扁圓		320
春陽	寬卵形	平板 中	淺綠	扁圓	淺綠	
Takii 中生紅甘藍	寬卵形	凸出 中	紫	-	-	-
春秋 1 號	橫寬橢圓形	凸出 中	白	圓球形	綠色	600

附錄三、各參試品種在各SSR基因座中的對偶基因形式與大小

Appendix 3. Allelic composition and size of 26 SSR loci in 98 cultivars of *B. oleracea*.

材料編號	分子標誌標號																									
	1	36	3	5	10	11	8	25	15	28	17	27	19	20	21	22	29	32	34	33	40	41	23	24	58	59
1	B	A	BC	C	A	B	A	A	AB	D	A	B	A	B	AC	AD	C	C	B	AB	GL	E	B	CE	CE	B
2	B	A	B	C	B	B	C	A	A	B	A	B	B	B	D	A	C	D	B	A	C	E	B	A	C	AB
3	B	A	AC	C	AB	B	C	A	A	B	A	B	B	B	DE	A	C	D	B	B	F	E	B	A	B	B
4	B	A	BC	C	B	B	C	A	AB	BD	A	B	C	B	DE	A	C	D	B	AB	FH	E	B	A	CE	AB
5	B	B	BC	C	B	B	C	A	A	BC	A	B	B	BC	DE	A	C	C	B	B	F	E	B	A	CE	B
6	B	B	BC	C	B	B	C	A	AB	CD	A	B	C	BC	DE	A	C	C	B	AB	H	E	B	A	CE	B
7	B	B	BC	C	B	B	C	A	A	B	A	B	B	BC	DE	A	C	C	B	A	DF	E	B	A	C	B
8	B	B	BC	C	B	B	C	A	A	B	A	B	B	B	DE	A	C	D	B	A	DF	E	B	A	C	B
9	B	A	B	C	B	B	C	A	A	B	A	B	B	C	D	AB	C	C	B	AB	I	E	B	F	C	AB
10	B	A	BC	C	B	B	C	A	AB	BD	A	B	C	B	DE	A	C	D	B	AB	I	E	B	A	C	AB
11	B	A	C	C	B	B	C	A	A	BD	A	B	C	B	DE	A	C	D	B	AB	H	E	B	A	E	B
12	B	B	BC	C	B	B	C	A	A	B	A	B	C	B	DE	A	C	D	B	AB	F	E	B	A	C	B
13	B	A	BC	C	B	B	C	A	A	BD	A	B	C	B	DE	A	C	D	B	B	CI	E	B	A	CE	A
14	B	A	BC	C	B	B	C	A	A	B	A	B	C	BC	DE	A	C	C	B	AB	FH	E	B	A	C	A
15	B	A	BC	C	AB	B	C	A	A	BD	A	B	C	BC	DG	A	C	C	B	B	CF	E	B	AD	C	A
16	B	A	C	C	B	B	C	A	A	BC	A	B	C	B	DE	A	C	D	B	B	F	E	B	A	C	B
17	B	B	C	C	B	B	C	A	A	B	A	B	C	B	DE	A	C	C	B	AB	F	E	B	A	C	A
18	B	A	C	C	B	B	C	A	A	B	A	B	C	B	D	A	C	D	B	A	F	E	B	A	C	A
19	B	A	C	C	B	B	C	A	AB	BD	A	B	C	B	D	A	C	D	B	A	FH	E	B	A	C	A
20	B	A	C	C	B	B	C	A	AB	CD	A	B	C	B	D	A	C	D	B	B	D	E	B	D	E	B
21	B	A	C	AC	A	B	AC	AB	AB	BD	A	AB	A	C	BE	AB	C	D	AB	AB	GK	A	AB	F	E	B
22	B	B	BC	C	A	BE	C	B	A	D	C	B	A	C	EG	AB	C	C	AB	B	K	A	B	F	CE	B
23	B	A	C	AC	A	B	AC	B	AB	BD	AC	B	A	C	AE	AB	C	C	AB	AB	GK	A	AB	F	E	B
24	B	A	BC	C	A	B	AC	A	A	D	C	BC	A	C	AE	AB	C	A	B	B	GK	A	B	F	E	B
25	B	A	BC	C	A	B	AC	A	A	D	C	BC	A	C	AE	AB	C	A	B	B	GK	A	B	F	E	B
26	B	A	C	D	A	B	AC	A	A	D	A	B	A	BC	DG	B	C	A	B	AB	GK	A	AB	AF	CE	B
27	B	A	C	CD	A	B	AC	A	A	D	A	B	A	B	E	B	C	C	B	B	K	A	B	AF	E	B
28	B	A	CD	A	A	BE	BD	AB	A	BC	BC	B	AB	C	A	D	C	D	A	B	GK	C	A	B	C	B
29	B	A	C	C	A	B	C	A	A	D	A	B	A	C	DG	B	C	D	B	B	GK	E	B	A	E	B
30	B	A	C	CD	A	B	C	A	A	D	AC	B	A	B	EG	B	C	D	B	B	GK	A	B	AF	E	A
31	B	A	BC	CD	A	B	C	B	A	D	A	B	C	C	DE	A	C	C	B	B	K	A	B	A	E	B

附錄三、續

Appendix 3. continued.

材料編號	分子標誌標號																											
	1	36	3	5	10	11	8	25	15	28	17	27	19	20	21	22	29	32	34	33	40	41	23	24	58	59		
32	B	A	BC	CD	A	B	AC	A	A	D	AC	BC	A	C	AE	AC	C	D	AB	AB	K	A	B	F	CE	B		
33	AB	B	C	AC	B	BD	BC	B	B	BD	A	B	A	B	D	AB	C	D	AB	B	G	A	A	EF	C	A		
34	A	B	C	AC	A	BD	B	B	B	B	A	BC	AB	BC	D	A	C	C	A	B	F	A	A	E	E	B		
35	A	A	C	A	A	BD	B	B	B	BD	A	B	A	B	D	A	C	C	A	B	G	A	A	FG	E	B		
36	A	B	C	AC	A	D	B	B	B	B	AC	BC	A	BC	D	A	C	C	A	B	IJ	A	A	F	E	A		
37	A	B	C	AC	A	D	B	B	B	B	AC	C	AB	B	D	A	C	D	A	B	GI	A	A	F	A	B		
ch1	B	B	C	C	A	D	B	B	B	B	AC	B	AB	B	D	A	A	D	A	B	F	E	A	F	E	B		
ch2	A	B	C	AC	A	D	B	B	B	B	AC	A	A	B	D	A	C	D	A	B	F	E	A	EF	E	B		
Ch3	A	B	C	AC	A	D	B	B	B	B	AC	A	AB	B	D	A	A	D	A	B	G	A	A	F	E	B		
Ch4	A	B	C	C	A	D	B	B	B	D	C	A	AB	B	D	A	AC	D	A	B	J	E	A	F	E	B		
Ch5	A	B	C	C	A	D	B	B	B	B	A	A	AB	B	D	A	C	D	A	B	I	E	A	F	E	B		
Ch6	A	B	C	C	A	D	B	B	B	B	AC	A	AB	BC	D	A	AC	D	A	B	I	E	A	F	E	B		
Ch7	A	B	C	AC	A	D	B	B	B	B	AC	A	B	B	D	A	AC	D	A	B	I	E	A	F	E	B		
Ch8	A	B	C	C	A	D	B	B	B	B	C	AC	A	B	D	AD	AC	D	A	B	I	E	A	EF	E	B		
Ch9	A	B	C	C	A	D	B	B	B	B	AC	A	B	AC	D	A	AC	D	A	B	I	E	A	F	E	B		
ch10	A	B	C	C	A	D	B	B	B	B	AC	A	B	AC	D	A	AC	D	A	B	G	E	A	F	E	B		
ch11	A	B	C	C	A	D	B	B	B	B	C	B	AB	B	D	A	C	D	A	B	I	E	A	F	E	B		
ch12	A	B	C	C	A	D	B	B	B	B	AC	A	B	C	D	A	AC	D	A	B	I	E	A	F	E	B		
ch13	A	B	C	C	A	D	B	B	B	B	AC	A	AB	B	D	A	AC	D	A	B	G	E	A	F	E	B		
ch14	A	B	C	C	A	D	B	B	B	B	A	A	A	BC	D	A	C	D	A	B	G	A	A	F	A	B		
ch15	A	B	C	C	A	D	B	B	B	B	AC	AC	A	B	D	A	C	D	A	B	I	AE	A	F	E	B		
ch16	A	B	C	C	A	D	B	B	B	B	AC	A	A	B	D	A	A	D	A	B	IJ	E	A	EF	E	B		
38	A	A	C	A	AB	CE	AD	B	AB	C	AC	B	A	B	CD	D	AC	D	AB	B	DK	E	BC	B	C	A		
39	A	A	C	AC	A	E	AD	B	A	C	AC	B	A	B	AD	AD	AC	D	AB	AB	GK	E	B	E	C	A		
40	A	A	CD	AC	AB	E	C	B	A	BC	C	AB	AB	B	AD	AD	C	D	AB	B	BG	E	C	E	C	B		
41	AB	A	AC	A	A	AB	D	AC	A	CD	AC	B	B	B	AD	D	C	C	B	B	EK	E	A	B	C	B		
42	B	A	CD	A	A	E	AD	BC	A	C	AC	B	A	B	A	DE	C	D	AB	A	EJ	E	B	CF	C	B		
43	B	A	C	CD	A	B	AC	A	A	D	A	B	A	C	D	AB	C	D	B	AB	GK	A	B	A	E	B		
44	B	A	CD	AC	A	BE	D	B	A	CD	AC	B	A	AB	A	AD	AC	D	B	A	G	E	C	E	A	B		
45	A	A	C	A	A	BE	D	AB	AB	C	BC	B	A	C	A	AD	AC	C	B	AB	CG	E	B	B	A	AB		

附錄三、續

Appendix 3. continued.

材料編號	分子標誌標號																											
	1	36	3	5	10	11	8	25	15	28	17	27	19	20	21	22	29	32	34	33	40	41	23	24	58	59		
46	A	A	CD	A	A	BE	AD	B	A	B	AC	B	AB	B	A	D	C	D	A	AB	G	E	B	E	A	A		
47	A	A	C	AC	A	E	AD	B	AC	C	AC	B	A	BC	AD	AD	AC	C	AB	AB	GK	E	B	E	C	A		
48	A	A	C	A	A	CE	A	B	AB	BC	AC	B	AB	BC	D	BD	AC	C	AB	AB	GK	E	B	B	C	A		
49	A	A	C	AC	A	BE	D	AB	A	AC	BC	B	AB	C	A	D	C	D	A	AB	K	E	A	B	C	B		
50	B	A	C	A	A	BE	D	B	A	A	AC	B	AB	C	DE	AD	C	D	A	AB	KL	E	B	EF	A	B		
51	B	A	C	AC	A	BE	CD	AB	A	AC	C	B	A	C	A	AD	C	D	A	B	K	E	AC	B	C	B		
52	B	A	AC	A	A	BE	CD	B	A	D	C	B	A	BC	A	AD	AC	D	AB	B	CK	E	B	E	C	AB		
53	B	A	C	AC	A	B	CD	AC	C	B	C	B	A	BC	A	D	C	C	B	B	CG	E	B	B	C	A		
54	B	A	C	A	A	BC	AD	B	B	BC	BC	B	AB	B	AD	AD	AC	D	B	AB	DK	E	BC	B	C	B		
55	A	A	C	A	A	CE	AC	BC	C	BC	AC	B	B	C	AE	AB	BC	C	B	B	GK	E	B	F	DE	B		
56	A	A	C	A	A	E	A	B	A	C	A	B	A	C	A	AD	C	D	B	AB	GJ	E	B	F	E	B		
57	B	A	AC	A	A	BE	D	BC	A	C	AC	B	AB	BC	A	D	C	D	AB	B	K	DE	B	C	C	B		
58	A	A	C	AC	A	CE	AC	BC	C	BC	AC	B	B	BC	AC	AD	BC	D	B	AB	GK	E	A	CE	CE	B		
59	B	A	D	C	A	BE	CD	BC	AB	A	C	AB	B	C	A	D	AC	D	AB	A	G	D	C	CF	E	B		
60	B	A	C	AC	A	CE	BC	BC	A	BD	AC	B	AB	C	A	D	BC	C	B	AB	GK	E	C	CE	E	B		
61	B	A	C	AC	A	E	AD	B	A	C	AC	B	A	BC	AD	AD	AC	C	AB	B	GK	E	B	E	C	A		
62	B	A	AD	A	A	B	A	A	AB	B	A	BC	AB	BC	AD	AC	C	C	AB	A	K	A	C	B	C	A		
63	A	A	C	C	A	B	A	AB	AB	D	A	C	AC	B	C	D	AC	D	B	AB	GJ	B	B	B	DE	A		
64	A	A	C	C	B	B	D	B	A	BC	C	C	B	B	CD	BD	AC	D	B	AB	I	E	C	D	CE	B		
65	B	A	C	CD	A	B	C	B	A	D	AC	B	A	C	DE	AB	C	D	AB	B	K	A	B	F	E	B		
66	B	A	C	CD	A	B	C	AB	A	D	AC	B	A	C	DE	AB	C	C	AB	AB	K	E	B	A	CE	B		
bru1	B	A	C	AB	A	A	D	A	B	CD	C	A	B	B	B	D	C	E	A	B	AF	E	B	B	C	B		
bru2	B	A	CD	A	B	A	D	A	AB	CD	A	A	AB	B	B	D	C	E	A	B	J	E	B	B	C	B		
bru3	B	A	CD	B	A	A	D	AC	AB	D	C	A	AB	B	B	E	C	B	A	AB	J	E	B	B	C	B		
bru4	B	A	C	AB	A	A	D	C	AB	CD	AC	A	B	B	B	D	C	E	A	AB	J	E	B	C	C	B		
bru5	B	A	C	A	A	A	D	AC	AB	CD	C	A	B	B	B	D	C	E	A	A	J	B	B	B	C	B		
bru6	B	A	C	AB	A	A	D	A	AB	CD	A	A	B	B	B	D	C	B	A	A	J	E	B	B	C	B		
bru7	B	A	C	AB	A	A	D	AC	A	D	AC	A	B	B	F	D	C	BE	A	AB	J	E	B	B	C	B		
bru8	B	A	CD	A	A	A	AD	A	AB	C	C	A	AB	B	F	D	AC	BE	A	AB	C	B	B	B	C	B		
bru9	B	A	CD	AB	A	A	D	B	A	CD	AC	A	AB	BC	F	D	C	D	A	AB	CK	E	B	E	C	B		
bru10	B	A	C	A	A	A	D	A	AB	CD	C	A	AB	B	F	DE	C	D	A	B	CK	B	B	B	C	B		

附錄三、續

Appendix 3. continued.

材料編號	分子標誌標號																											
	1	36	3	5	10	11	8	25	15	28	17	27	19	20	21	22	29	32	34	33	40	41	23	24	58	59		
bru11	B	A	CD	A	A	A	D	AC	AB	D	C	A	AB	B	F	D	C	B	A	AB	CJ	E	B	B	C	A		
bru12	B	A	C	B	B	A	D	A	A	C	C	AB	B	B	CF	DE	C	B	A	AB	J	E	B	B	C	B		
bru13	B	A	C	AB	A	A	D	AC	A	CD	C	A	A	B	C	D	C	B	A	A	CH	B	B	B	C	B		
bru14	B	A	C	A	B	A	D	AC	A	C	A	A	B	B	C	DE	C	B	A	AB	CH	E	B	B	C	A		
bru15	B	A	C	A	B	A	D	C	A	C	AC	A	B	B	F	D	C	D	A	AB	J	E	B	C	C	B		
bru16	B	A	C	A	A	A	D	C	AB	D	A	A	B	B	C	D	C	B	A	AB	CJ	B	B	C	C	B		
Alleles size (bp)																												
A	189	174	87	274	108	193	211	266	176	168	126	193	186	176	188	200	235	273	158	222	137	343	289	231	180	214		
B	191	179	94	311	110	202	212	268	189	180	141	196	190	178	192	202	236	275	162	224	144	344	296	233	196	223		
C			98	313		203	216	270	203	189	144	214	192	182	198	203	240	282			146	346	298	241	197			
D			100	315		205	220			191					200	206		283			148	349		242	199			
E						207									202	208		284			152	358		245	203			
F															204						156			247				
G															206						157			251				
H																					158							
I																					159							
J																					161							
K																					163							
L																					165							

註：只有一個字母者為同質結合

附錄四、本次試驗參與篩選之58組SSR分子標誌

Appendix 4. The sequence and refence of 58 SSR markers in this study.

Marker	Chr.	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Motif	Reference
MB1		CAATAATGATGAGATGAAATAAGG	GCACTAAGGCAGCTAAAAAGTGGAT	(GA) ₉	(Lagercrantz et al., 1993)
MB2		TAAATTAACAAGTACAAAGCGG	TCACCTCGTCTCGTCTCTCT	(GA) ₂ GC(GA) ₄ (GT) ₂	(Lagercrantz et al., 1993)
MB4	C9	TGTTTTGATGTTTCCTACTG	GAACTGTGGCTTTTATTAC	(TG) ₁₀	(Lagercrantz et al., 1993)
MB5		AACATCTTTTTCGCTGATAT	AATAGCATTGAAGCCTTAC	(AT) ₃ GT(AT) ₄ (GT) ₈	(Lagercrantz et al., 1993)
BN12A	C1	GCCGTTCTAGGGTTTGTGGGA	GAGGAAAGTGAGAGCGGGGAAATCA	(GA) ₁₁ (AAG) ₄	(SzewcMcFadden et al., 1996)
BN38A		TGGTAACCTGTAACCGACGAAATC	ACGCTGTCTTCAGGTCCCACTC	(TG) ₁₁	(SzewcMcFadden et al., 1996)
BN72A	C4	GCCCACCCACCTTCTTGTCCT	CCCTTCATCCAAACTCCTCCTCGT	(TAA) ₅ (GA) ₉	(SzewcMcFadden et al., 1996)
BN83B1	C3	GCCTTTCTCACAACCTGATAGCTAA	TCAGGTGCCTCGTTGAGTTC	(GA) ₁₁	(SzewcMcFadden et al., 1996)
CALSSR	C1	GTTAAGTGTGGCGTTAGAGG	CCTTGGTACATGCCCACTGAA	unknown	(Smith and King, 2000)
SSR Na10-D03		ATGATTTGCCTTGAAATGCC	GATGAAACAATAACCTGAGACACAC	(GT) ₁₁	(Lowe et al., 2002)
SSR Na10-E02		TCGCGCATGTAATCAAAAATC	TCTGACGCATCCGATCATAC	(GA) ₂₄	(Lowe et al., 2004)
SSR Na10-F06		CTCTTCGGTTCGATCCTCG	TTTTTAAACAGGAACGGTGGC	(CCG) ₆	(Lowe et al., 2004)
SSR Na12-A01		GCACTGCTCTTGATGAACGAA	GCTTCAACCTCTCAATCGCT	(CT) ₃₄	(Lowe et al., 2004)
SSR Na12-A02		AGCCTTGTGCTTTTCAACG	AGTGAATCGATGATCTCGCC	(CT) ₁₆	(Lowe et al., 2004)
SSR Na12-A07		TCAAAAGCCATAAAGCAGGTG	CATCTTCAACACGCATACCG	(GT) ₁₁	(Lowe et al., 2004)
SSR Na10-B10		GTCGGGTTTGAGTGAGTTGG	CATCGCAGATCCTTCTCTCC	(GGC/A/T) ₁₈	(Lowe et al., 2004)
Ni4B10	C8	GTCCTTGAGAAACTCCACCG	CCGATCCCATTCTTAATCCC	(CT) ₂₀	(Lowe et al., 2004)
O110F11	C8	TTTGGAACGTCCTAGAAAGG	CAGCTGACTTCGAAAGGTCC	(GGC) ₇	(Lowe et al., 2004)
O112F2	C6	GGCCCATTTGATATGGAGATG	CATTTCTCAATGATGAATAGT	(TC) ₂₉	(Lowe et al., 2004)

附錄四、續

Appendix 4. continued.

Marker	Chr.	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Motif	Reference
OII2G4	C7	CGAACATCTTAGCCCGAATC	GGTTAACTGCGGGATATTG	(TC) ₂₄	(Lowe et al., 2004)
OII0H4	C4	TCACCCCTCTATATCCACCC	CAGAATCTGCCTGAACATCG	(CT) ₂₉	(Lowe et al., 2004)
OII2D5	C7	TCCATGACCAACGACAAAGGTC	AAGAGCGACTTCTATTGCG	(CT) ₃₂	(Lowe et al., 2004)
OII0F12	C2	TCCATGTTTCATGTGTGGAGG	CTCTCGGCTTCACCTTCC	(CT) ₆₄	(Lowe et al., 2004)
OII1H8	C2	ATCGAAGGCCAAATCACC AAG	CAGTGATTCAGAGGTATAGAG	(AG) ₂₄	(Lowe et al., 2004)
BoABI1		TATCAGGGTTTCCCTGGGTTG	GTGAACAAAGAAGAAAAGAGGCC	(TC) ₁₆	(Tonguc and Griffiths, 2004)
BoPC15		GAAACAGAAAGGCACACAGGGT	GCCTAAATGGCTTTTGATCTT	(TTTTA) ₂ (ATA) ₇	(Tonguc and Griffiths, 2004)
BoPLD1		GACCACCGACTCCGATCTC	AGACAAAGCAAAATGCAAGGAA	(CT) ₇ (AT) ₇₋₁	(Tonguc and Griffiths, 2004)
BoCALa		TTGTAATGTAAACAAAAGGGG	CAAAATGAAACAATTCTCAGGG	(AT) ₅ (TA) ₆	(Tonguc and Griffiths, 2004)
BoCALb		GTAATTCCTTGATAATTGC	TCTGATGTGTTTGTGATGTCC	(TA) ₆₋₁	(Tonguc and Griffiths, 2004)
BoCALc		GTGGCGTTAGAGGTTGATGG	TCAAAGAGTCAGATCGAGACGG	(TAA) ₃₋₁ (AT) ₇₋₁ (AT) ₃	(Tonguc and Griffiths, 2004)
BoREM1b		TCCGAAAAGTGGGAAAAGG	TGTGTCAGAAAAGCGAGAAGG	(AAG) ₅	(Louarn et al., 2007)
BoDCTD1		AGAAAAGCAGACGGGAATGG	TGGTTAAAGCGAAAGTGTC	(AGA) ₆	(Louarn et al., 2007)
BoCAM1		GCTGATGTTGATGGTGATGG	GCCGAAGCAGACAAATAAAAC	(GA) ₅	(Louarn et al., 2007)
BoKAH45TR		ATTATGACGCCTGGTTTTA	ATTGGTTAGAAAGTTATGGGAAC	(TTG) ₆	(Louarn et al., 2007)
BoIAB20TR		TCTCACCTATCTTCTCTCTTCTTTC	CGCCTCGTCTCTTCTCTC	(CAC) ₉	(Louarn et al., 2007)
BoIAB19TF		AAGCCACCTCACCTTAGCC	GAAATCCAGAGACTGAAAACC	(GA) ₆	(Louarn et al., 2007)
BoIAB94TF		CCAAAGATTACAGAGGAAATGG	GCGTCAAAAAACGGGTGTCG	(CGG) ₅	(Louarn et al., 2007)
BoPC34		TCCAAAGACCGTAGAGGAGGA	AAGCCAACAACACTTCAACAACA	(ATG) ₅	(Louarn et al., 2007)
FITO353	C5	ATCGCTGTTCGGTGGGTT	GTGCCAATAAAGTGTAAGGGA	unknown	(Iniguez-Luy et al., 2008)

附錄四、續

Appendix 4. continued.

Marker	Chr.	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Motif	Reference
FITO259	C5	ACAAATCCTGTTCACTTCTT	ATCACCTCTCCCTCTCTATT	unknown	(Iniguez-Luy et al., 2008)
FITO497	C7	TGGTGTGGTAATTTCTTTGT	ATTTATTCATTCTCTACGGG	unknown	(Iniguez-Luy et al., 2008)
FITO398	C7	CAGAAACTTGGAAAGAAACAA	TACTAAACGGAAACGAAACTG	unknown	(Iniguez-Luy et al., 2008)
FITO472	C7	CGTCTTTGACCTTTCTATCTG	TGCCCTTGTTCCTTCTTTT	unknown	(Iniguez-Luy et al., 2008)
FITO161	C2	AGCCAGGGTTACACAGAGA	CCCAGAAAGAGGGAGTCAG	unknown	(Iniguez-Luy et al., 2008)
FITO102	C4	TAACTCATCAAAACCAATGCCA	CGTCCAACACAAACACTTACT	unknown	(Iniguez-Luy et al., 2008)
FITO514	C4	TCTCAAGGTTTGTGCTCTGT	ACGGTTGCGTTCTATGTAAGT	unknown	(Iniguez-Luy et al., 2008)
FITO400	C6	AGCCACGAAGAGAGAGACTT	TAAGAGGAGAAAGAGAGCGT	unknown	(Iniguez-Luy et al., 2008)
FITO565	C6	GGTCTCTCCTCAAGTAATGGTC	TCAATCCTCTCTCAAAATCAAG	unknown	(Iniguez-Luy et al., 2008)
FITO377	C4	CATCACGCTTCACACTTATTT	TATTTGCTTTTCCATCATTT	unknown	(Iniguez-Luy et al., 2008)
FITO067	C6	TTTCCCATAAACTTCTCATTT	GCTTCATCGCTAATACTGCT	unknown	(Iniguez-Luy et al., 2008)
FITO043	C6	AAAGTCGTGGGAAGTATCGT	AGGTGTAAGGATGGTGGTAGT	unknown	(Iniguez-Luy et al., 2008)
FITO036	C6	GGATTGCCTGAGTTTATTCTT	TCTGGAGTAGATGCTTTGGT	unknown	(Iniguez-Luy et al., 2008)
FITO190	C6	AGTCACACATTCCCAGCC	GTAATCCCAGCATCCAGAA	unknown	(Iniguez-Luy et al., 2008)
FITO429	C6	ATTAGGGAGGAAGCGGTG	AGACAGAGAGACGAGGAGAGA	unknown	(Iniguez-Luy et al., 2008)
sORA21b	C6	TTCAGCACTAGTCAATGG	TCCTTCTCAGGCACTCTT	(GA) ₂₂	HRI unpublished (Periam, N; King GJ)
sORA26	C5	TGTTTACCTGTTGGAGAT	AACCCCTAAGCATCTGCGA	(GA) ₅	HRI unpublished (Periam, N; King GJ)
sORA43	C5	GCGCGTGTGGGATCAGAA	CTTCTCACCGTCGATCG	(GGC) ₇	HRI unpublished (Periam, N; King GJ)
Apl1a 5pr	C9	GAGAGAAATTTGATGATGAACAT	CCTTTTACCTGTATCTTCTATTAG	unknown	HRI unpublished (Barker GC)